

Faculté des sciences

Cartographie des interactions protéine-protéine et protéine-ADN au sein du complexe central méiotique

Auteur-es : Ossogo Mballa Christelle Danielle

Promoteur-rices : Corentin Claeys Bouuaert & Hajar AïT-Bella

Lecteur-rices : Ghislain Michel & Hallet Bernard

Année académique 2022-2023

Intitulé du master et de la finalité : Master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire à finalité spécialisée : Biotechnologies

Remerciements:

Un merci infini pour celui qui m'a donné la chance d'apprendre et de réaliser mon travail de recherche dans son laboratoire, je vais nommer Corentin Claeys Bouuaert. Merci pour ce projet de recherche finement élaboré, pour lequel j'ai pris plaisir à travailler et à développer un raisonnement logique que j'espère guidera mes pas de scientifique tout au long de ma vie professionnelle. Merci des conseils et informations aussi bien scientifiques que personnels reçus pendant les meetings individuels et qui ont meublé mon quotidien tout au long de cette année de labeur. Merci de la patience et de la confiance accordée, merci également de souvent embellir les choses, ça nous fait nous sentir moins bête.

À mon superviseur Hajar Ait Bella, mille mercis pour exprimer ma gratitude. Merci pour m'avoir délégué une partie de ton projet, merci de tes explications, merci pour la répétition, merci pour le travail strict et rigoureux que tu enseignes. Bien entendu, merci de la patience vis-à-vis de mes incompréhensions et de mes erreurs. Enfin merci pour ton implication et tes conseils dans la suite de ma vie scientifique.

Je m'en vais aussi remercier toute l'équipe du CCB Lab. Pascaline pour son aide quotidienne en ce qui concerne le fonctionnement du laboratoire (tu es l'âme de ce laboratoire), Cédric et Karen pour les conseils, Dima pour les conversations et le petit nom d'amour (kiko), Marita pour ta présence et soutien inconditionnel (tu vas trop me manquer), Priyanka for your help in improving my english and your access card, Chi Wai (My favorite person of the Lab) great thank you for your love. Mahesh and David thank you for the laughter, the explanations and the kindness.

Merci aux équipes FYMO et BGM pour leur présence dans ce quotidien de travail acharné. Merci pour de la patience. Merci à Alexandra pour les sourires et les conseils, ça fait toujours du bien.

Un Merci particulier à Mr Hallet qui m'a soutenu tout au long de la réalisation de mon master. Merci infiniment de tous les encouragements reçus.

Merci aux professeurs qui ont su ou même simplement essayé de répondre à toutes mes préoccupations pendant cette formation.

Merci à ma maman, tu es certainement la seule personne qui s'intéresse à si je fais attention à ne pas dépasser mes limites. Merci de toujours prendre soin de moi malgré que je sois vieille fille déjà. Merci tout particulier à Daniel.

Merci à ma famille, mes frères, mes amis et tous ces proches sans qui j'aurais probablement abandonné. Merci infiniment de votre soutien.

Résumé :

Dans les cellules méiotiques (lignée germinale), lors du brassage génétique, la cellule initie via un complexe protéique, la formation de cassures doubles brins d'ADN qui sont ensuite réparées grâce à un mécanisme basé sur la recombinaison homologue, utilisant le chromosome homologue comme matrice. Ces mécanismes sont responsables de la diversité génétique. La formation des cassures double brin est hautement régulée et fait appel à une dizaine de protéines organisés en complexes (RMM, MRX et le core complex). Spo11, endonucléase principalement impliquée dans la genèse des cassures doubles brins est une enzyme évoluée d'une topoisomérase de type 2, TopoVI avec qui (TopoVIA), il partage des similarités structurelles et fonctionnelles. Dans le but d'étudier le rôle des protéines du core complex méiotique dans les interactions protéine-protéine et protéine-ADN, ce travail a permis de tester des hypothèses élaborées sur base d'alignement de séquences et d'analyse de la structure Cryo-EM du core complex obtenue d'un laboratoire partenaire et permettant de démêler le mécanisme d'action du core complex méiotique sur l'ADN. Les résultats obtenus sont insuffisants pour confirmer ou infirmer les hypothèses énoncées. il reste cependant des expériences et résultats en attente de réalisation ou d'analyse pour obtenir une vue d'ensemble du mécanisme de formation des cassures doubles brins pendant la méiose.

Abstract :

In meiotic cells (germline), during genetic mixing, the cell initiates, via a protein complex, the formation of DNA double-strand breaks which are then repaired by a mechanism based on homologous recombination, using the homologous chromosome as a template. These mechanisms are responsible for genetic diversity. The formation of double-strand breaks is highly regulated and involves about ten proteins organized in complexes (RMM, MRX and the core complex). Spo11, the endonuclease mainly involved in the genesis of double-strand breaks, is an enzyme evolved from a type 2 topoisomerase, TopoVI, with which it shares structural and functional similarities (TopoVIA). With the aim of studying the role of the proteins of the meiotic core complex in protein-protein and protein-DNA interactions, this work made it possible to test hypotheses developed on the basis of sequence alignment and analysis of the Cryo-EM structure of the core complex obtained from a partner laboratory and making it possible to unravel the mechanism of action of the meiotic core complex on DNA. The results obtained are insufficient to confirm or refute the stated hypotheses. However, there are still experiments and results awaiting completion or analysis to obtain an overview of the mechanism of double-strand break formation during meiosis.

Liste des abréviations :

ADN	Acide Desoxyribo Nucléique
Amp	Ampicilline
DSB	Double strand break
Kan	Kanamycine
KoAc	Acétate de potassium
LiAc	Acétate de lithium
MRX	Mre11-Rad50-Xrs2
ONPG	Ortho-nitrophenyl-B-galactoside
O/N	Overnight
PCR	Reaction de polymérisation en chaine
QCM	Quick Change Mutagenesis
RMM	Rec114-Mei4-Mer2
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA

Table de matières:

1	Introduction	15
1.1	La méiose	15
1.2	Les complexes protéiques intervenant lors de la méiose	17
1.3	Relation évolutive entre le core complex méiotique et les topoisomérases. 17	
1.3.1	Les topoisomérases IIB	17
1.4	Le core complex	19
1.4.1	La protéine Spo11 : une enzyme liée aux topoisomérases de type IIB. 19	
1.4.2	Les protéines Rec102 et Rec104.....	20
1.4.3	La protéine Ski8	20
1.5	Structure et mécanisme.....	21
2	Objectifs et stratégie	23
2.1	Objectifs	23
2.1.1	Rôle d'un motif conservé de Rec102 (kink) dans la dynamique structurale du core complex.	23
2.1.2	Rôles des protéines Rec102 et Rec104 dans les interactions avec l'ADN.	24
2.1.3	Dimérisation de Spo11.....	24
2.1.4	Rôle de la protéine Ski8 au sein du core complex.	24
2.2	Stratégie	25
2.2.1	Test de complémentation ou heteroallele recombination assay.....	25
2.2.2	Yeast-two-Hybrid	26
3	Matériels et méthode.....	27
3.1	Transformation d'ADN dans des bactéries thermo-compétentes	27
3.2	Extraction d'ADN bactérien (Miniprep)	27
3.3	Clonage par la méthode de Gibson	27
3.4	Électrophorèse sur gel d'agarose	28

3.5	Extraction sur gel d'agarose	28
3.6	PCR (polymerase chain reaction).....	28
3.7	Quick change Mutagenesis et digestion à la Dpn1	29
3.8	Digestion par enzyme de restriction	30
3.9	Transformation d'ADN dans des levures diploïdes.....	30
3.10	Extraction D'ADN génomique	31
3.11	Heteroallele recombination assay (Return to growth).....	31
3.12	Test de sensibilité à la chaleur	32
3.13	Yeast Two hybrid.....	33
4	Résultats et discussion	34
4.1	Dynamique structurale de Rec102 : rôle du Kink.....	34
4.2	Rôle des protéines Rec102/Rec104 dans l'interaction avec l'ADN.	35
4.2.1	Etude des mutants par le test de sensibilité à la chaleur	37
4.2.2	Construction de la souche de levure MATa mutée Rec102 ^{K79E/R89E}	38
4.2.2.1	<i>Construction plasmide pour souche de levure</i>	39
4.2.2.2	<i>Digestion EcoR1 du plasmide et gel d'agarose</i>	39
4.2.2.3	<i>Transformation en levures et PCR géotypage</i>	40
4.2.2.4	PCR clean-up et séquençage.....	41
4.2.2.5	<i>Dimérisation de Spo11.</i>	41
4.2.3	Rôle de Ski8 au sein du core complex.....	43
5	Conclusion	46
6	Bibliographies	47
7	Annexes	51

1 Introduction

La planète Terre compte depuis le 15 novembre 2022, 8 Milliard d'êtres humains. Mais, (excepté les vrais jumeaux) tous les individus sont génétiquement différents les uns des autres. Cette diversité est une conséquence de la recombinaison génétique qui a lieu entre les chromosomes homologues lors de la méiose.

1.1 La méiose

La méiose est le processus par lequel une cellule diploïde se divise et donne naissance à quatre cellules haploïdes. Seules les cellules de la lignée germinale ont recours à ce mécanisme dans le but d'assurer une diversité génétique et la viabilité des gamètes produits (Hunter, 2015; Page & Hawley, 2003; Yadav & Claeys Bouuaert, 2021). La formation de crossover entre chromosomes homologues permet un contact physique essentiel pour le positionnement correct sur le fuseau achromatique et une séparation précise vers les pôles opposés de la cellule lors des premières étapes de la division (Hunter, 2015; Page & Hawley, 2003). En effet, la méiose se déroule en deux étapes fondamentales : la méiose I, pendant laquelle on observe une séparation des chromosomes homologues suivant une étape de réplication (Page & Hawley, 2003) et la méiose II au cours de laquelle se fait la séparation des chromatides sœurs (Page & Hawley, 2003) (**Figure 1**). La séparation de manière fidèle des chromosomes homologues dépend d'un mécanisme de recombinaison homologue. Tout d'abord, les chromosomes subissent des cassures double-brin à l'échelle du génome entier grâce à l'action de l'endonucléase Spo11 (Keeney et al., 1997) (**Figure 2**). Cette dernière reste attachée de façon covalente aux extrémités 5' de l'ADN clivé. Puis ces sites de coupure sont traités par des enzymes accessoires requises pour la réparation de l'ADN. Brièvement, suite au clivage de l'ADN, l'action d'endo- et exonucléases permettent l'exposition de longs fragments simple brin aux extrémités 3' qui vont envahir les séquences homologues sur l'homologue chromosomique et réparer l'ADN par synthèse du brin complémentaire (Symington, 2016; Wright, 2018; Yadav & Claeys Bouuaert, 2021). La réparation peut se faire de plusieurs manières (**Figure 2**), la première au cours de laquelle, les structures de recombinaison sont stabilisées par des protéines de type "ZMM" ce qui produit des croisements dans lesquels les deux extrémités de la cassure s'engagent avec le donneur pour former un intermédiaire constitué de doubles jonctions d'Holliday, résolu par une voie spécifique au croisement

(crossover) (Pyatnitskaya et al., 2019). Le second moyen est l'éjection du brin envahissant du donneur par l'action d'enzymes telles que des hélicases, ce qui permet aux extrémités de l'ADN de se resouder. Ici il n'y a pas de croisements, et donc pas d'échanges réciproques de fragments de chromosomes. Néanmoins, il s'effectue un transfert local d'information génétique entre le brin à réparer et la matrice homologue (Yadav & Claeys Bouuaert, 2021).

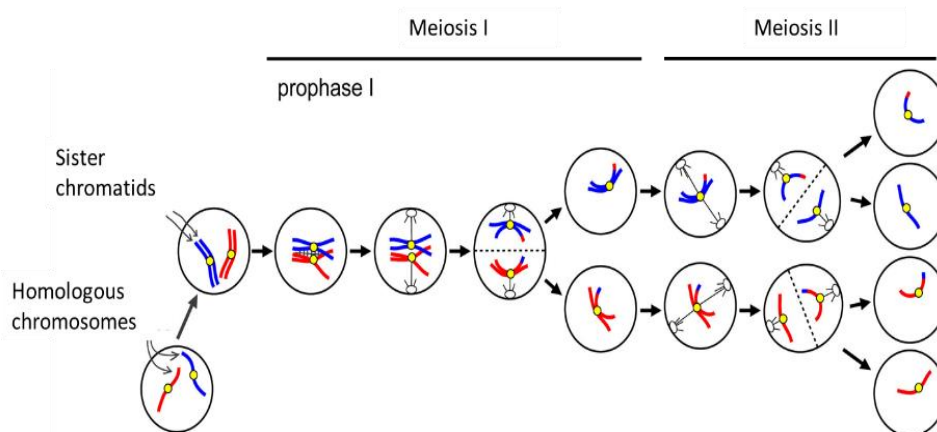


Figure 1 :

La méiose est un processus de divisions cellulaires à deux étapes permettant la génération de gamètes haploïdes à partir de cellules diploïdes. Après une phase de duplication de l'ADN, la première étape (méiose I) permet la ségrégation des chromosomes homologues tandis que la seconde (méiose II) permet la séparation des chromatides sœurs.

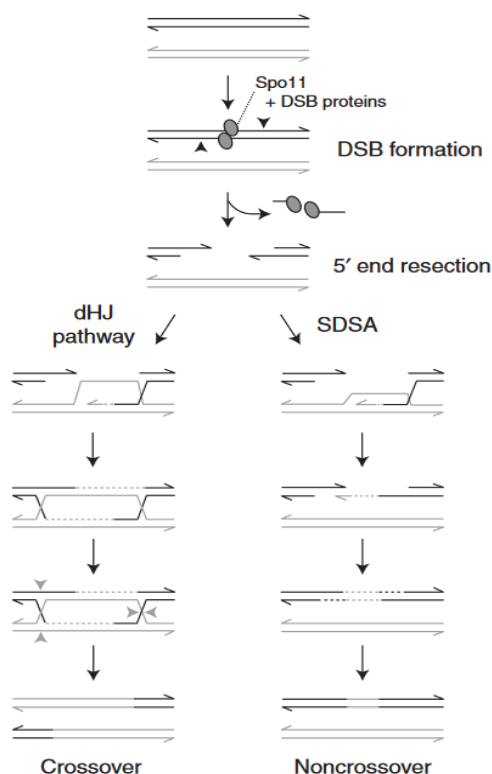


Figure 2 :

Schéma de recombinaison méiotique. Spo11 initie la recombinaison méiotique en introduisant des cassures double-brins dans l'ADN qui sont à leur tour réparées grâce à deux voies distinctes. dHJ double Holliday Junction, SDSA recuit de brin dépendant de la synthèse.

1.2 Les complexes protéiques intervenant lors de la méiose

Chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, la recombinaison méiotique résulte de la formation et de la réparation des cassures double brin sur l'ADN. La formation de ces cassures lors de la prophase I nécessite dix protéines réparties en trois sous-complexes connus : le complexe RMM (Rec114, Mei4, Mer2), le complexe MRX (Xrs2, Mre11, Rad50) (Kee & Keeney, 2002; Keeney, 2001) et le core complex formé de quatre protéines (Spo11, Rec102, Rec104 et Ski8) (Yadav & Claeys Bouuaert, 2021) (**Figure 3**). Bien que ces partenaires aient été identifiés depuis des décennies, le manque de caractérisation biochimique de ces complexes laissent énormément de questions en suspens quant aux aspects mécanistiques qu'ils renferment.

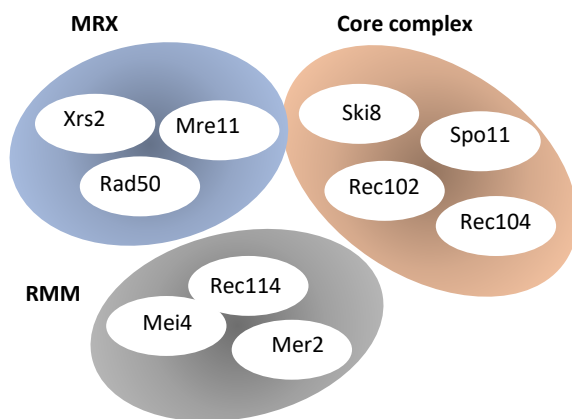


Figure 3 :

*Dix protéines sont requises pour la formation des cassures méiotiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.*

Ce travail est focalisé sur le mécanisme d'action du core complex et précisément le rôle des protéines y intervenant lors de la recombinaison méiotique.

1.3 Relation évolutive entre le core complex méiotique et les topoisomérases

1.3.1 Les topoisomérases IIB

La structure et de la topologie de l'ADN sont essentiels à des mécanismes clés tels que la réplication, la transcription, et la recombinaison. Les topoisomérases appartiennent à la famille d'enzymes connues pour concaténer et/ou decaténer les super bobines négatives et/ou positives de l'ADN, ce qui sert à réguler le remodelage de l'ADN. Il existe deux types de topoisomérases, qui en catalysant la cassure d'un ou

deux brins d'ADN, sont catégorisés sous deux familles : les topoisomérases de type I et les topoisomérases de type II (Champoux, 2001; Gadelle et al., 2003). Parmi les topoisomérases de type II, on distingue deux sous-familles, les topoisomérases IIA et IIB. Les enzymes de type IIA sont présentes chez toutes les bactéries (ADN gyrase et topo IV) et les eucaryotes (topo II), tandis que, la topo VI (enzyme de type IIB), est présente chez les archées et aussi chez les plantes (Gadelle et al., 2003).

Topo VI est un hétérotétramère (A_2B_2) de deux sous-unités A et B qui dans un processus ATP-dépendent, catalyse la formation de cassures double-brins sur l'ADN via une activité de transestérification (Corbett et al., 2007). La sous-unité A (Topo 6A) est dotée d'une activité endonucléasique et Topo 6B est composée des domaines GHKL ATPasique et transducer responsables de la reconnaissance, liaison et courbure de l'ADN (**Figure 4**) (Wendorff & Berger, 2018).



Figure 4 : Schémas organisationnels de Topo VI (gauche) et du core complex (droite) montrant les similarités entre les deux complexes.

Le cycle de réaction de Topo6 (**Figure 5**) consiste en la liaison d'un duplex d'ADN, le segment G ou « gate », par les domaines de clivage de l'ADN de l'enzyme. Puis, la capture d'un second duplex, appelé segment de transfert ou segment T, lors de la dimérisation des modules GHKL et sa liaison à l'ATP (Corbett, 2003; Corbett et al., 2007; Nichols, 1999).

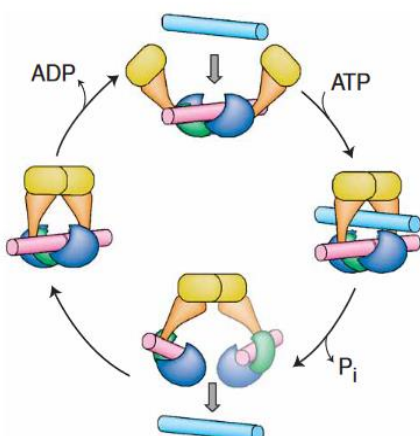


Figure 5:

Mécanisme d'action de la Topo IV. Liaison du segment G (rose) à la région de clivage de l'ADN de l'enzyme, piégeage d'un segment T (cyan) lors de la liaison à l'ATP et la dimérisation des domaines ATPase, hydrolyse de l'ATP accompagnant le clivage du segment G et le passage du segment T et ressoudure du segment G (Corbett et al., 2007)

L'activité endonucléasique de la TopoVI A est possible grâce à la présence de deux domaines structuraux font partie du site actif de catalyse : un motif 5Y-CAP contenant la tyrosine catalytique et un domaine Toprim contenant une poche de liaison à l'ion Mg^{2+} (Keeney, 2001; Nichols, 1999). TopVIA agit comme un dimère avec deux sites actifs hybrides pour le clivage de l'ADN, chacun comprenant les domaines 5Y-CAP et Toprim de monomères séparés. Ceux-ci s'attaquent aux deux brins de l'ADN et génèrent des intermédiaires 5'-phosphotyrosyl (**Figure 6**) qui pourront ensuite être resoudés après le passage du duplex d'ADN intact.

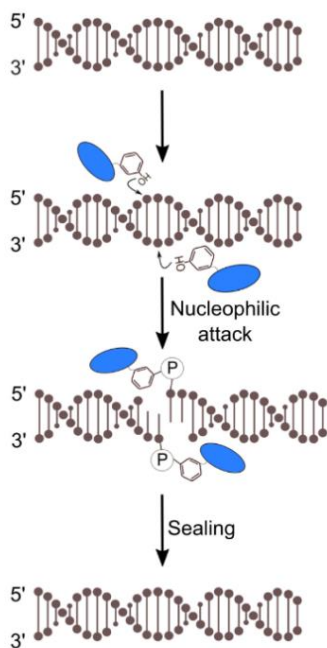


Figure 6 :

Chimie du brin clivage par une attaque nucléophile et de la réparation de l'ADN par scellement en TopoVI. (Yadav et Claeys Bouuaert, 2021)

1.4 Le core complex

Le core complex désigne le complexe protéique qui comporte précisément la sous-unité qui catalyse la formation des cassures double brins sur l'ADN : Spo11, et des protéines partenaires telles que Rec102, Rec104 et Ski8.

1.4.1 La protéine Spo11 : une enzyme liée aux topoisomérases de type IIB

Des similarités structurelles (**Figure 4**) et fonctionnelles ont été établies entre Spo11, l'unité endonucléasique de clivage de l'ADN du core complex méiotique et la sous unité catalytique des topoisomérases de type 2, suggérant une même origine

évolutive entre les deux complexes protéiques (Bergerat et al., 1997; Gadelle et al., 2003). Cependant il existe des différences de fonctionnement entre les deux enzymes. Tout d'abord, à ce jour, aucune activité de re-ligation n'a été démontrée pour Spo11 qui reste attaché par des liaisons covalentes aux extrémités 5' de l'ADN (Neale, 2005; Yadav & Claeys Bouuaert, 2021) (**Figure 2**). De plus, des résultats obtenus pour la stœchiométrie du core complex montrent que c'est un monomère constitué de 4 protéines : Spo11, Rec102, Rec104 et Ski8 (Claeys Bouuaert et al., 2021). Sachant que des analyses structure-fonction entre TopoVIA et Spo11 soutiennent l'hypothèse que lors de la formation des cassures double brins méiotiques, Spo11 agit suivant un mécanisme similaire à celui de la topoisomérase VI (Nichols, 1999). C'est-à-dire qu'il doit dimériser afin de former le site catalytique composé, formé du site contenant la tyrosine catalytique d'un monomère et du site de fixation de l'ion Mg^{2+} du second monomère.

1.4.2 Les protéines Rec102 et Rec104

Bien que Spo11 ait été identifié comme un homologue de la sous-unité A de TopoVI depuis les années 90, aucun homologue de la sous-unité B n'avait été identifié. Jusqu'en 2016, ou un homologue de TopoVIB, a été identifié chez la plante (Vrielynck et al., 2016) et la souris (Robert et al., 2016). Chez *S. cerevisiae*, l'homologue de TopoVIB est Rec102, protéine identifiée précédemment comme partenaire essentiel de Spo11 (Arora et al., 2004), mais des similitudes avec TopoVIB n'avaient pas été identifiées en raison de leurs divergences de séquences. En outre, contrairement à la sous-unité de type B de TopoVI chez les souris et les plantes, Rec102 est dépourvue du domaine GHKL essentiel à la dimérisation dépendante de l'ATP. Récemment, des données de crosslinking et de mutagenèse ont prouvé que Rec104 occupe la position du domaine GHKL dans le core complex (Claeys Bouuaert et al., 2021). De plus, la protéine Rec104 ne contient aucun motif reconnaissable de liaison à l'ATP et d'hydrolyse, tandis que chez les souris et les plantes, la sous-unité de type B en a conservé certaines (Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016).

1.4.3 La protéine Ski8

Mis à part les protéines Spo11 et Rec102-Rec104 structurellement semblables aux sous-unités A et B de TopoVI, le complexe méiotique de formation des cassures doubles brins sur l'ADN requière une sous-unité supplémentaire Ski8 dont le rôle est

actuellement inconnu. Néanmoins, une interaction entre Spo11 et Ski8 s'avère être nécessaire pour la localisation chromosomique des protéines du core complex Rec102 et Rec104 (Arora et al., 2004).

1.5 Structure et mécanisme

Des données de microscopie à force atomique (Claeys Bouuaert et al., 2021) montrent que le core complex se lie de différentes manières sur l'ADN : le complexe se lie sur un duplexe d'ADN et induit probablement la courbure du duplexe. En outre, le complexe se lie également à des jonctions de duplexes d'ADN obtenues à la suite de la capture des segments G et T de façon similaire qu'une topoisomérase lierait un segment G et T. Enfin, le complexe se lie également aux extrémités double brin d'un substrat linéaire (**Figure 7**).

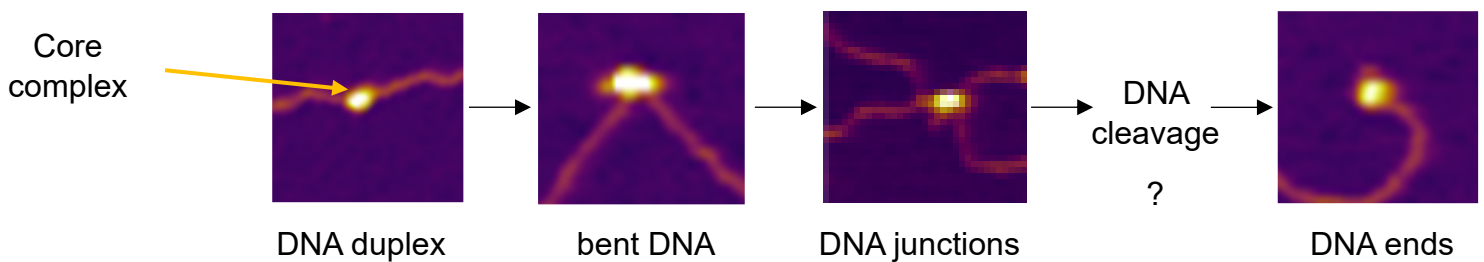


Figure 7 :

Résultats de microscopie de force atomique (AFM) qui montrent les différents modes de liaison du core complex à l'ADN.

Sur base des données de microscopie de force atomique, et par analogie avec TopoVI, nous proposons le modèle suivant (**Figure 8**) :



Figure 8 :

Modèle du mécanisme putatif d'action du complexe Spo11. Brièvement, (i) le complexe dimériserait suite à la liaison à un duplex DNA, (ii) entraînerait sa courbure, (iii) piègerait un second duplex à proximité ce qui stimulerait l'activité de clivage de Spo11 avant le libérer sous forme de complexe nucléoprotéique covalent.

Pendant que ce mémoire était en cours, le laboratoire de Scott Keeney a obtenu par Cryo-EM une structure du core complex lié à l'ADN (**Figure 9**). Cette structure représente le complexe monomérique lié à une extrémité double brin, et représente donc la structure du complexe post-catalytique. Elle a été utilisée pour élucider le rôle des protéines du core complex, analyser leurs interactions et interroger les conditions de dimérisation dudit complexe.

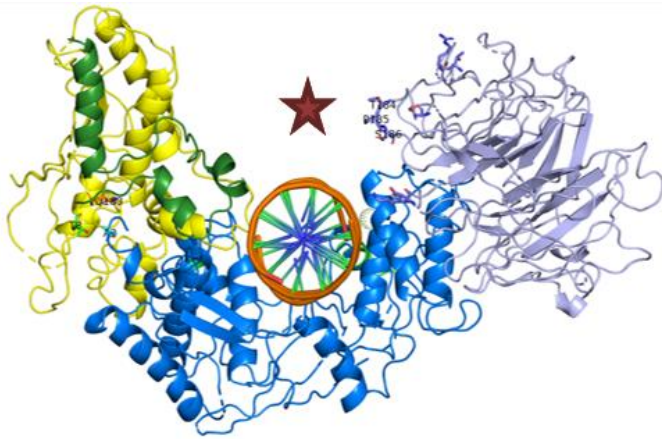


Figure 9 : Structure Cryo-EM du core complex monomérique obtenue du laboratoire de Scott Keeney et présentant les protéines Rec102 (jaune), Rec104 (vert), Spo11 (bleu) et Ski8 (gris). L'étoile représente la position hypothétique du second duplex d'ADN (Segment T)

2 Objectifs et stratégie

2.1 Objectifs

Tout au long de ce travail, nous essaierons de tester notre modèle, l'objectif principal étant de comprendre quels sont les caractéristiques de Spo11 et les protéines partenaires Rec102, Rec104 et Ski8 nécessaires à la formation des cassures méiotiques.

2.1.1 Rôle d'un motif conservé de Rec102 (kink) dans la dynamique structurale du core complex.

Sur la base d'un alignement de séquences (**Annexe 1**) on observe la présence d'une région conservée appelée kink dans le domaine transducer-like (**Figure 10**) de la protéine Rec102 de différentes levures. L'hypothèse concernant le rôle de ce motif serait que certains résidus conservés dans le kink pourraient être importants pour les changements de configuration qui accompagnent la liaison du core complex à l'ADN.

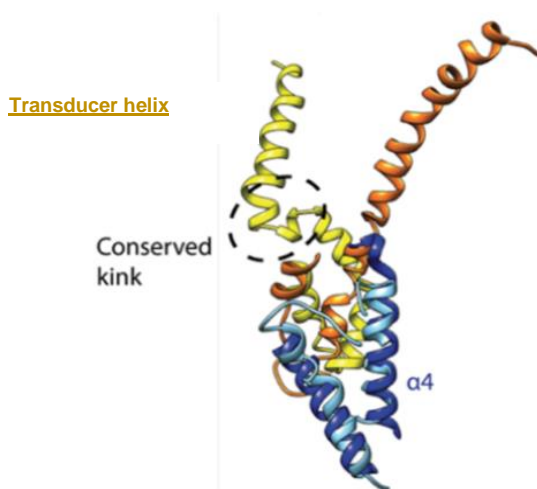


Figure 10 : Superposition de la structure de Topo VIB avec le modèle AlphaFold du complexe Spo11-Rec102 (Humphreys et al., 2021)

2.1.2 Rôles des protéines Rec102 et Rec104 dans les interactions avec l'ADN.

TopoVIB participe dans la liaison de TopoVI à l'ADN, la courbure de l'ADN, et l'interaction avec le segment T (Wendorff & Berger, 2018). Nous pensons également que le core complex interagit avec deux segments d'ADN. Sachant que les protéines Rec102 et Rec104 représentent des homologues structurels de TopoVIB, l'hypothèse à tester serait de savoir si les protéines Rec102 et Rec104 du core complex sont impliqués dans les modes de liaison et de courbure de l'ADN au même titre que TopoVIB. De plus, l'analyse de la structure Cryo-EM du core complex (**Figure 9**) nous montre la présence de résidus chargés positivement, présents dans les protéines Rec102 et Rec104 et qui pourraient interagir avec de l'ADN chargé négativement.

2.1.3 Dimérisation de Spo11.

Spo11 doit dimériser de façon similaire à TopoVI. Sur base de la structure Cryo-EM du core complex (**Figure 9**), nous allons cibler des résidus qui pourraient être impliqués dans la dimérisation de Spo11.

2.1.4 Rôle de la protéine Ski8 au sein du core complex.

Le rôle de la protéine Ski8 n'est pas encore établi, néanmoins nous pensons que certains résidus présents dans la protéine et orienté vers la position d'un segment T d'ADN pourraient être impliqués dans des interactions protéine-ADN. Nous allons tester cette hypothèse par mutagenèse.

2.2 Stratégie

Pour tester les différentes hypothèses découlant du modèle lié au mécanisme d'action du core complex, nous avons principalement utilisé deux expériences permettant d'évaluer d'un côté l'activité de recombinaison méiotique et de l'autre l'interaction protéine-protéine des mutants générés.

2.2.1 Test de complémentation ou heteroallele recombination assay

Cette expérience permet de mesurer le taux de recombinaison des levures diploïdes. En effet, des levures diploïdes sont obtenues après croisement de deux souches haploïdes portant chacune une mutation différente *arg-nsp* ou *arg-bgl* dans le gène *ARG4* nécessaire à la synthèse de l'arginine. À la suite d'une recombinaison homologue entre les deux gènes défectueux pendant le croisement, le gène *ARG4* peut être restauré, ce qui rend la cellule apte à croître sur milieu sélectif (SC-R) (**Figure 11**). Ces levures préalablement délétées pour les protéines testées seront complétées lors de l'expérience par des plasmides mutants et leur activité de recombinaison sera comparée par le biais de leur croissance sur milieu sélectif à un contrôle négatif (le plasmide vide) et un contrôle positif (le plasmide exprimant la protéine sauvage).

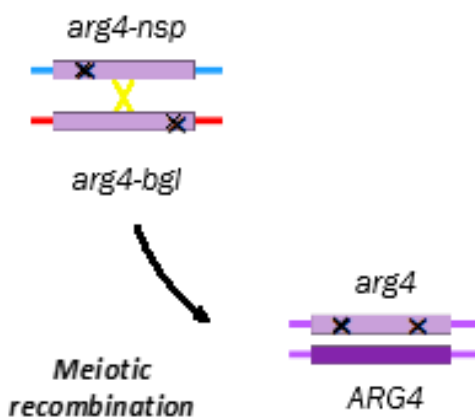


Figure 11 : Principe d'obtention des levures diploïdes capables de synthétiser de l'arginine au départ de levures haploïdes défectueuses pour le gène de l'arginine après la recombinaison homologue

2.2.2 Yeast-two-Hybrid

Cette expérience teste l'interaction entre deux protéines. Dans ce cas, elle est utilisée pour vérifier que le défaut de recombinaison observé en test de complémentation n'est pas lié à un défaut d'interaction entre les deux protéines testées. Ici des levures sont transformées avec des plasmides codant les protéines d'intérêt. L'une fusionnée à un domaine de fixation (LexA) et l'autre à un domaine activateur (Gal4). Les activités d'interaction entre les partenaires sont quantifiées par mesure de l'activité d'hydrolyse d'un substrat ONPG par la beta-galactosidase produite suite à l'interaction entre les différents domaines.

Au terme de ces expériences, les mutants dont je suis intéressée doivent abolir l'activité de recombinaison du core complex, mais conserver l'interaction entre les protéines testées. Autrement dit, ils doivent être défectueux en test de complémentation et effectifs en test d'interaction.

3 Matériels et méthode

3.1 Transformation d'ADN dans des bactéries thermo-compétentes

La transformation bactérienne permet d'insérer un plasmide d'intérêt dans une souche d'*Escherichia coli* thermo-compétente (Top10 ou DH5 α). Pour ce faire, un tube contenant 400 μ L de bactéries a été dégivré sur glace. Dans un nouvel Eppendorf, 100 μ L a été rajouté à 1 μ L d'ADN (5 ng/ μ L) plasmidique et laissé sur glace pour 30 minutes. Le tout est plongé dans un bain marie à 42°C pour 45 s et ensuite remis pour 2 minutes dans de la glace. 1 mL de milieu de régénération SOC est ajouté au mélange et transféré dans un nouveau tube de 15mL et agité pendant 1 heure sous 120 rpm à 37°C. 100 μ L de la culture est ensuite étalé sur une boîte de pétri contenant le bon antibiotique et le reste est centrifugé avant d'être étalé sur une deuxième boîte de pétri. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 12 heures.

3.2 Extraction d'ADN bactérien (Miniprep)

Cette technique a été utilisée pour extraire de l'ADN plasmidique bactérien. Pour cela, une colonie isolée de bactéries est prélevée de boîtes de pétri et re suspendue dans 4mL de milieu de culture LB préalablement préparé avec l'antibiotique correspondant à la résistance exprimée par l'ADN à extraire. La culture a été incubée sous 120 rpm à 37°C overnight. Après récupération, la culture a été centrifugée et le protocole de QIAprep Spin Miniprep Kit utilisé pour réaliser l'extraction.

3.3 Clonage par la méthode de Gibson

Le clonage a été utilisé pour insérer une séquence d'ADN dans un vecteur plasmidique. Le vecteur et l'insert sont mélangés en proportions molaires 1:3. Au mix a été rajouté 4 μ L de Gibson mix 2X et 3 μ L d'eau. Le tout a été porté à incubation pendant 30 minutes à 50°C avant d'être transformé en bactéries et étalé sur boîte de pétri.

3.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour préparer 200ml de gel d'agarose 1% (w/v). le tout a été chauffée dans un micro-onde jusqu'à l'obtention d'une solution translucide, du Midori est rajouté à la solution selon un ratio de 5µL pour 100mL de gel à préparer, puis la solution est coulée dans un dispositif approprié pour gel et laissé refroidir pendant 45 minutes. Le gel est immergé dans un volume suffisant de tampon de migration TBE 1x, les échantillons mélangés à un tampon de charge et déposés dans des puits du gel. Et le tout migre à 180V pendant 1 heure et 30 minutes.

3.5 Extraction sur gel d'agarose

Cette méthode a été utilisée pour extraire de l'ADN provenant d'un échantillon chargé sur gel d'agarose. Une fois que le gel a été observé, grâce à de la lumière UV, les bandes d'ADN visibles sur gel sont découpées, transférées dans un Eppendorf de 1,5mL et pesées. En fonction du poids net de gel récolté, le volume des solutions à utiliser varie. Pour réaliser cette expérience, le kit de gel extraction de QIA a été utilisé.

3.6 PCR (polymerase chain reaction)

Elle a permis d'amplifier un fragment d'ADN au départ d'un ADN parental. Il a été question de préparer un mix de 50µL avec les constituants suivants :

	Final	pour 50 µl
5x Buffer (HF or GC)	1x	10 µl
10 µM Primer 1	0.5 µM	2.5 µl
10 µM Primer 2	0.5 µM	2.5 µl
10 mM dNTP	200 µm	1 µl
DMSO (optionel)	3%	1.5 µl
ADN parental	variable	variable
Phusion polymerase		0.3 µl
H ₂ O		to 50 µl

Les échantillons préparés ont ensuite été placé dans la machine PCR et les paramètres suivants ont été encodés:

Step	Temp	Time
1	98 °C	30 sec
2	98 °C	10 sec
3	55 °C	20 sec
4	72 °C	2 mins
Repeat 2-4, 29x		
	72 °C	10 mins
	4 °C	hold

3.7 Quick change Mutagenesis et digestion à la Dpn1

C'est une technique qui a été utilisée pour insérer une mutation ponctuelle dans une séquence d'ADN parental donné. Un mix de 50µL a été préparé en mélangeant les réactifs suivants :

	Final	For 50 µl
5x Buffer (HF or GC)	1x	5 µl
10 µM Primer 1	0.5 µM	1 µl
10 µM Primer 2	0.5 µM	1 µl
10 mM dNTP	200 µM	1 µl
DMSO (optionel)	3%	1.5 µl
ADN parental	50 ng	variable
Pfu turbo polymerase		0.3 µl
H ₂ O		to 50 µl

Les échantillons préparés ont ensuite été placés dans la machine PCR et les paramètres suivants ont été encodés:

Step	Temp	Time
1	98 °C	30 sec
2	98 °C	10 sec
3	45 °C	20 sec

4	65 °C	6 mins/kb
Repeat 2-4, 16x		
	65 °C	10 mins
	15 °C	hold

Une fois le programme achevé, 1 µL de Dpn1 a été rajouté à chaque échantillon et la digestion s'est faite à 37°C overnight.

3.8 Digestion par enzyme de restriction

La digestion enzymatique a été utilisée pour couper précisément une séquence d'ADN, en l'occurrence des plasmides au niveau des sites de restriction de l'enzyme utilisée présents sur l'ADN à digérer. En effet, si l'échantillon à digérer provient d'une PCR, une digestion à la Dpn1 a été effectuée au préalable. Ensuite, 10 µl d'échantillon est digéré en présence de 0,3 µl d'enzyme de restriction, 2 µl de cutsmart et 17 µl d'eau. L'ensemble est mis à 37°C pendant 1h.

3.9 Transformation d'ADN dans des levures diploïdes

Elle a été utilisée pour intégrer un ADN (plasmide) dans une souche de levure. Après avoir sélectionné les souches haploïdes (a et α) à utiliser du congélateur à -80°C. A l'aide d'un cure dents, une petite quantité de levures est prélevée et croisée sur une boîte de pétri YPD. Cette boîte a été incubé pendant un peu plus de 24 heures à 30°C. Les levures ont ensuite été striées sur une nouvelle boîte afin d'obtenir des colonies isolées et incubé pendant 48 heures à 30°C. Les colonies diploïdes isolées sont prélevées et resuspendues chacune dans 4 mL du milieu liquide YPD et incubé dans le shaker à 30°C overnight. 1,5 mL de cette préculture est ensuite ajoutée à 25 mL de YPD et cultivée dans un erlenmeyer pendant 8 heures dans le Shaker à 30°C. la culture a été récupérée et centrifugée pendant 3 minutes à 3220 g, puis lavée 2 fois avec 25 mL d'eau stérile. Le culot a été solubilisée dans 1 mL d'eau et transférée dans un tube Eppendorf. Short spin (16000 g, 1 seconde) et le culot est resuspendu dans 1 mL de LiAc à 100 mM. short spin (16000 g, 1 seconde) et le culot est resuspendu dans 50 µL de LiAc à 100 mM. Les cellules ont été incubées dans un bain marie à 30 °C pendant 15 minutes. D'un autre coté, 5 µL d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml)

a été dénaturé à 100 °C pour 5 minutes et mis sur glace. A cela, ont été rajouté 5 µL d'ADN à transformer, 50 µL de cellules dans du LiAc 100 mM, 240 µL de PEG 3350 (50%), 25 µL d'eau et 30 µL de LiAc 1M. la culture a été vortexée et incubée au bain marie à 30°C pour 20 minutes. Puis, 36 µL de DMSO y ont été rajouté et le tout a été plongé dans un bain marie à 42°C pendant 7 minutes. 1 mL d'eau a été rajouté, et centrifugé pendant 1 seconde à 16000 g. 100 µL a été étalé sur boîte de pétri contenant la bonne résistance et le reste a été centrifugé puis étalé sur une autre boîte de pétri.

3.10 Extraction D'ADN génomique

Cette expérience a pour but d'extraire l'ADN génomique de levures à des fins de génotypage. Ici, les levures sont perméabilisées grâce à un cocktail d'enzymes et solutions d'hydrolyse des constituants de la paroi cellulaire tels que de la zymolyase, de l'EDTA, du sorbitol et de la protéinase K. Ensuite, les sphéroplastes perméabilisées sont précipitées avec du KoAc pendant 1h à 65°C et l'ADN est ensuite extraite grâce à de l'éthanol 70% et solubilisé dans du tampon TE et digéré avec de la RNase.

3.11 Heteroallele recombination assay (Return to growth)

Cette expérience a permis de mesurer le taux de recombinaison des levures diploïdes. En effet, ces levures diploïdes sont obtenues après croisement de levures haploïdes portant chacune une mutation différente (arg-nsp et arg-bgl) dans le gène qui code pour la synthèse de l'arginine. À la suite d'une recombinaison homologe correcte entre les deux gènes défectueux pendant le croisement, la levure diploïde obtenue s'en sort avec le gène de synthèse de l'arginine restauré ce qui la rend apte à croître sur milieu sélectif (SC-R) (**Figure 11**). Après avoir transformé ces levures diploïdes avec les plasmides portant les diverses mutations à tester, 3 clones sont prélevés et resuspendus dans 4 ml de milieu de culture dont la résistance est compatible à celle des levures cultivées. La préculture est ensuite incubée dans le shaker à 30°C overnight. Par la suite on centrifuge la culture à 3220 g pendant 3 minutes, le culot est ensuite resuspendu dans 1 ml de KoAc et incubé overnight à 30°C dans le shaker. 100 µL de la culture récupérée est dilué dans 900 µL d'eau stérile. Le tout est ensuite dilué en cascade 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et étalé suivant une matrice de spots sur 3 boîtes de pétri (YPD, SC-W et SC-R). ces boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 heures.

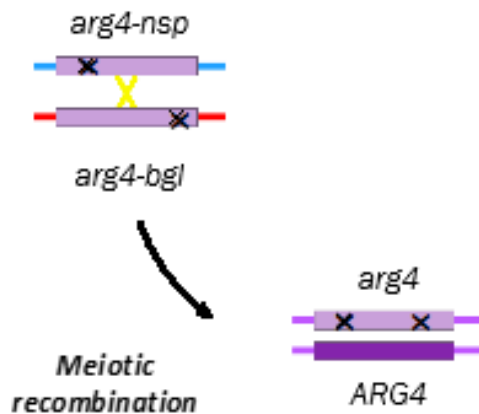


Figure 11 : Principe d'obtention des levures diploïdes capables de synthétiser de l'arginine au départ de levures haploïdes défectueuses pour le gène de l'arginine après la recombinaison homologue

3.12 Test de sensibilité à la chaleur

Cette expérience a permis de mesurer le taux de recombinaison des levures diploïdes en situation de stress induite par une augmentation de la température lors de l'induction de méiose. En effet, des levures haploïdes défectueuses pour le gène de synthèse de l'arginine (ARG4) ont été utilisées pour cette expérience. C'est-à-dire que les levures haploïdes portent chacune une mutation différente (arg-nsp et arg-bgl) dans le gène qui code pour la synthèse de l'arginine. À la suite d'une recombinaison homologue correcte entre les deux gènes défectueux pendant le croisement, la levure diploïde obtenue s'en sort avec le gène de synthèse de l'arginine restauré ce qui la rend apte à croître sur milieu sélectif (**Figure 11**). Ces levures étaient également délétées pour le gène de la protéine étudiée. Après croisement, elles ont été transformées avec des plasmides contenant les séquences mutantes de la protéine étudiée. Ensuite, les levures ont été cultivées dans du milieu de return to growth (Sc-Trp) qui permet de maintenir la pression de sélection nécessaire pour le maintien des plasmides utilisés pour la transformation. Puis, induite en méiose avec du potassium acétate (KOAc) et séparément incubé à 30 et 37°C pendant plus de 24h. Ensuite les cultures ont été diluées en cascade et étalé sous forme des spots de 10µl sur boîtes YPD (contrôle positif), Sc-W (contrôle négatif) et Sc-ARG (boîte test). Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 3 jours

3.13 Yeast Two hybrid

Cette technique est utilisée pour tester l'interaction entre 2 protéines. Des levures ont été transformés avec des plasmides codant nos protéines d'intérêt. L'une fusionnée à un domaine de fixation (LexA) et l'autre à un domaine activateur (Gal4). Ces levures possédant un gène de synthèse de la bêta-galactosidase sont perméabilisées grâce à un triple cycle de gel et degel dans de l'azote liquide et mises en contact avec le composé ONPG dont l'hydrolyse par la bêta-galactosidase provoque l'apparition d'une coloration jaune dans le milieu. L'interaction protéine-protéine est évaluée par la mesure de l'absorbance du milieu grâce à un spectrophotomètre.

4 Résultats et discussion

4.1 Dynamique structurale de Rec102 : rôle du Kink.

La présence et la conservation (**Annexe 1**) du motif kink (EYPMVF) présent dans une région du domaine transducer-like de la protéine Rec102 (**Figure 10**) nous a porté à interroger son rôle dans l'activité de recombinaison méiotique. Ce motif pourrait être important pour des changements de configuration impliqués lors de la formation des cassures d'ADN. Pour tester cette hypothèse, des résidus du motif ont été mutés puis caractérisés en test de complémentation et test d'interaction. Les mutants auxquels on s'attend sont défectueux pour la recombinaison et effectif en double hybride (Y2H). Les résultats obtenus indiquent que le seul mutant défectueux en recombinaison ('kink-As' dont les six résidus du motif sont mutés en alanine, **Figure 12**), montre également un défaut d'interaction avec Rec104 en Y2H (**Figure 13**). Ces résultats ne supportent donc pas notre hypothèse, et le motif a probablement un rôle structural plus fondamental, mais pas nécessairement lié à des transitions conformationnelles.

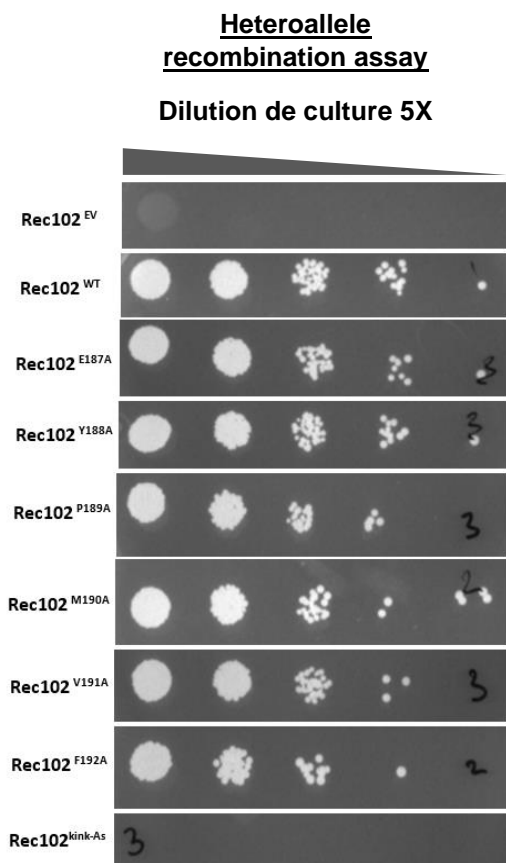


Figure 12 : Expérience de recombinaison permettant de révéler les mutations affectant les activités de recombinaison du core complex. Les constructions empty vector et protéine WT sont utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement.

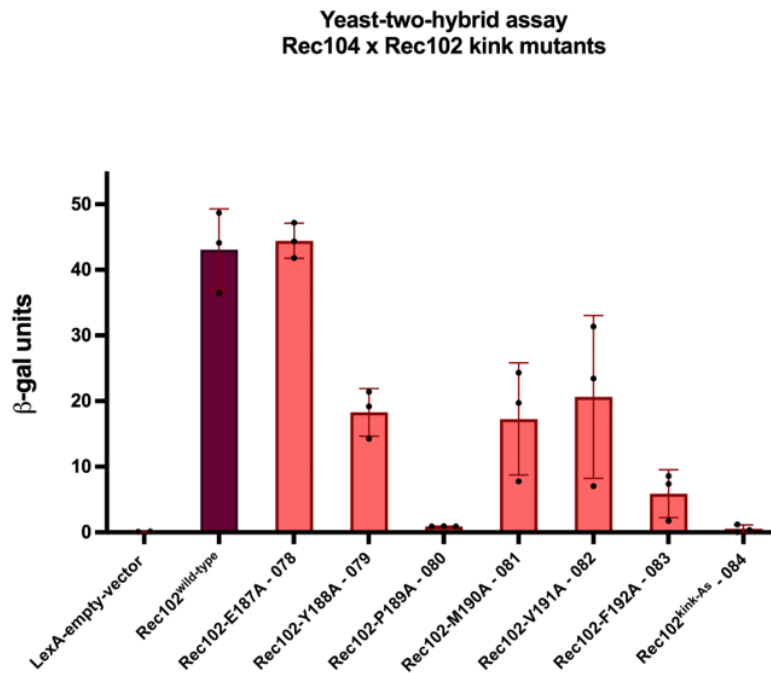


Figure 13 : Analyses de l'interaction protéine-protéine entre les mutants kink de Rec102 fusionnés avec un domaine de liaison LexA, avec les protéines natives (A) Rec104 et fusionnées avec un domaine d'activation Gal4. Les activités d'interaction entre les partenaires sont quantifiées par mesure de l'activité d'hydrolyse d'un substrat ONPG par la beta-galactosidase produite suite à l'interaction entre les différents partenaires.

4.2 Rôle des protéines Rec102/Rec104 dans l'interaction avec l'ADN.

Sur la base du mécanisme d'action de TopoVI et des similarités structurelles et fonctionnelles entre TopoVI et le core complex, nous avons pour hypothèse que les protéines Rec102 et Rec104 participent à l'interaction entre le core complex et l'ADN. Pour tester cette hypothèse, Hajar Aït-Bella a identifié et muté une série de résidus positifs présents dans ces protéines. Cependant, parmi ces mutants, très peu ont montré un effet important en test de complémentation (**Figure 14**).

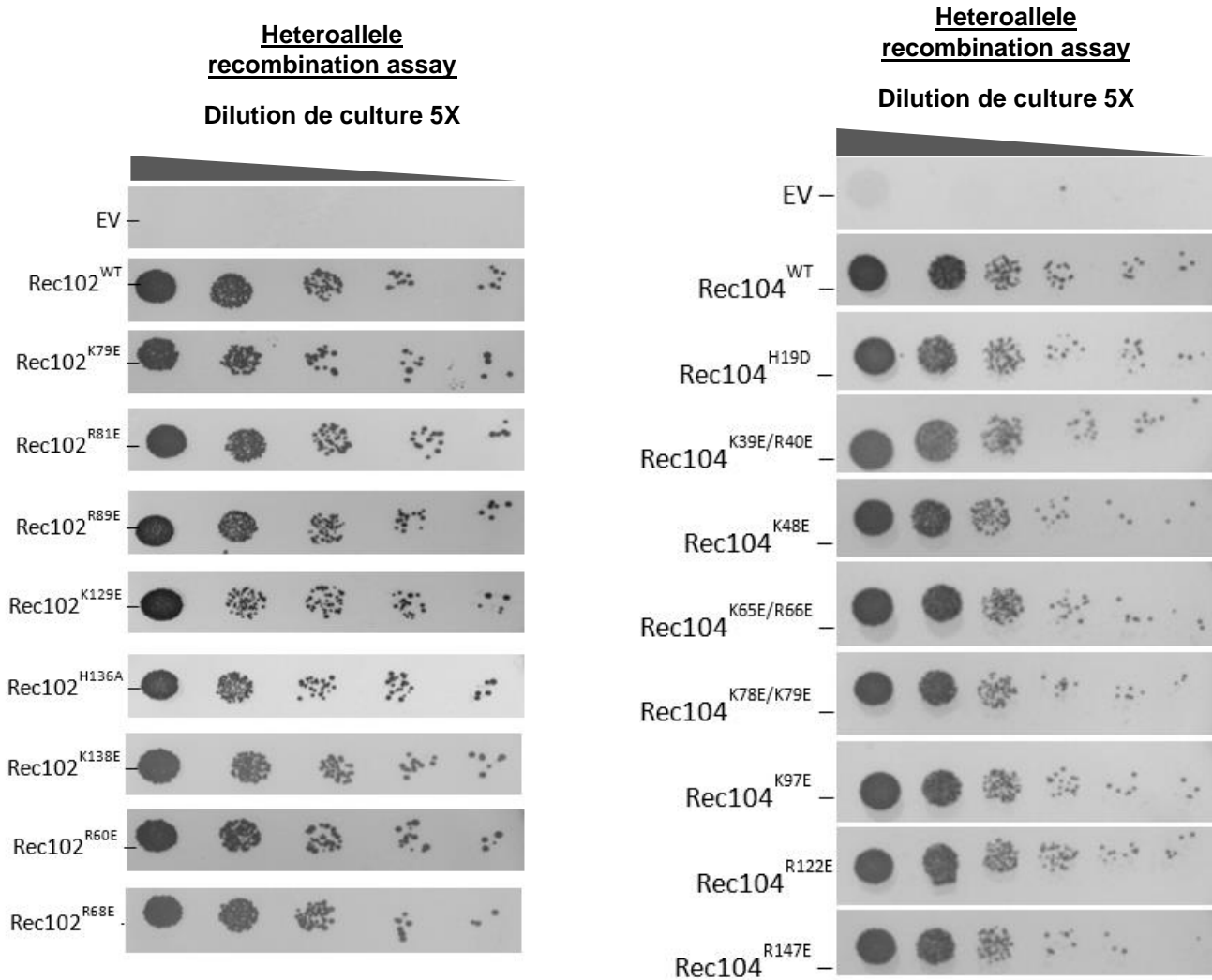


Figure 14 : Résultats des tests de complémentation réalisés par Hajar sur les mutants des protéines Rec102 (gauche) et Rec104 (droite). les mutants identifiés ici présentent une activité de recombinaison proche de celle des protéines sauvages.

Il est néanmoins possible que les résidus testés soient impliqués dans la réaction de liaison et courbure à l'ADN mais que l'effet des mutations sur la formation des cassures soient trop subtils pour être détectés. Cependant, ces résultats n'invalident pas notre hypothèse sur leur importance car, sachant que la formation de cassures double brins est potentiellement dangereuse pour la survie de la cellule, la machinerie de recombinaison, spécialement l'activité de Spo11 est hautement régulée. Cette régulation est mise en place pour assurer un timing, un nombre et une distribution appropriés des cassures, et impliquent des mécanismes de régulation proactifs et réactifs (Claeys Bouuaert et al., 2021; Yadav & Claeys Bouuaert, 2021). Ceci dit, pour un mutant dont l'activité de recombinaison n'est pas totalement abolie, le timing de formation et réparation des DSB peut être plus long que chez le Wild type.

C'est dans le but de révéler un phénotype en rajoutant une source de stress liée à la température, que nous avons opté pour un test de sensibilité à la chaleur.

4.2.1 Etude des mutants par le test de sensibilité à la chaleur

Sur la base des données de test de complémentation (**Figure 14**) obtenues par Hajar, et compte tenu des voies de régulation de l'activité endonucléasique de Spo11, nous émettons l'hypothèse que le phénotype des mutants pourrait être exacerbé dans des conditions plus stringentes. Pour tester cela, nous avons réalisé un test de complémentation dans des conditions de stress thermique. Nous nous attendons ainsi à identifier des mutants sensibles à la température. Les résultats obtenus pour les mutants de Rec104 (**Figure 15**) ne révèlent pas de sensibilité à la température. Cependant, la plupart des mutants montrent une faible diminution de l'activité de recombinaison à 30 et à 37 °C, contrairement aux résultats obtenus par Hajar (**Figure 14**, droite). Ceci suggère que ces résidus pourraient être impliqués pour l'interaction du core complex à l'ADN. Pour la suite des investigations, nous pensons à combiner les résidus afin de générer des doubles ou triples mutants et tester leurs activités de recombinaison.

Malheureusement, par défaut de temps, nous n'avons pas pu obtenir des données du test de sensibilité à la chaleur des mutants générés sur la protéine Rec102. Il serait donc recommandé pour la suite des manipulations, d'effectuer le test et de comparer les résultats à ceux obtenus pour le Wild type.

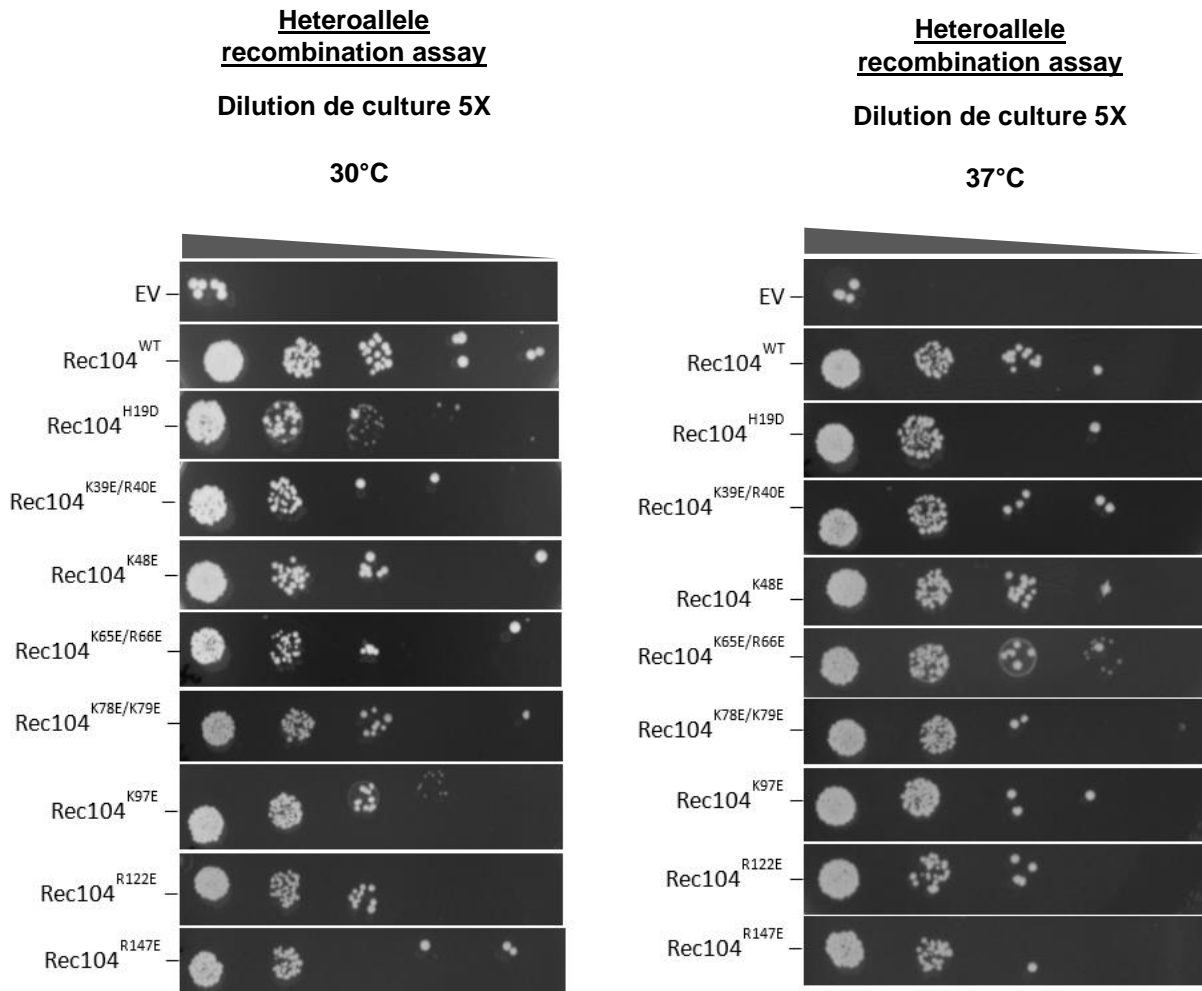


Figure 15 : Test de sensibilité à la chaleur réalisée sur les mutants Rec104 permettant de révéler les mutations affectés par le changement de température. Les constructions empty vector et protéine WT sont utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement.

4.2.2 Construction de la souche de levure MATa mutée Rec102^{K79E/R89E}

En plus de tester les mutants de la protéine Rec102 par un test de complémentation en conditions de stress thermique et sur base de la structure de la protéine Rec102 obtenue par Cryo-EM (**Figure 16**) nous avons identifié deux résidus K79 et R89, tous les deux présents sur la même hélice alpha. Le fait que cette hélice soit orientée vers la position hypothétique d'un second duplex d'ADN (équivalent au brin 'T' des topoisomérases), pourraient impliquer ces résidus dans le croisement de deux duplexes d'ADN. Nous pensons qu'une analyse de la cinétique de la formation

des cassures sur l'ADN nous permettra de mettre en évidence le rôle des résidus Rec102-K79E/R89E. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit une souche contenant le gène Rec102 muté. Le but sera de quantifier la formation de cassures d'ADN dans cette dernière par Southern Blot.

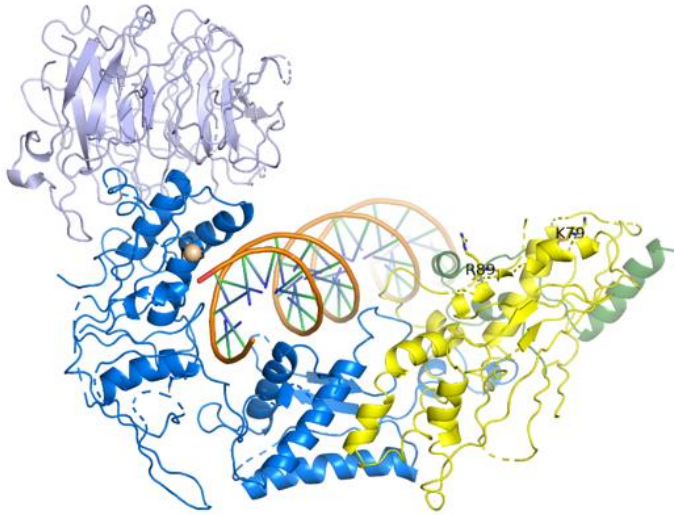


Figure 16 : Structure du core complex obtenue par Cryo-EM et montrant la position des résidus identifiés sur la protéine Rec102 (jaune) présents sur la même hélice alpha pointant vers la position potentielle d'un second duplex d'ADN

4.2.2.1 Construction plasmide pour souche de levure

Cette étape a pour but d'obtenir un plasmide dépourvu de tags utilisable pour des expériences in vivo. Pour y parvenir, nous avons utilisé la technique de Quick Change Mutagenesis pour muter le plasmide initial Rec102 (pCCB758) contenant la protéine Wild type suivie d'une cassette de résistance NAT-MX. Le plasmide mutant obtenu est nommé pHAB090 (Rec102-K79E/R89E) (**Figure 17**) (**Tableau 1 : liste des plasmides**)

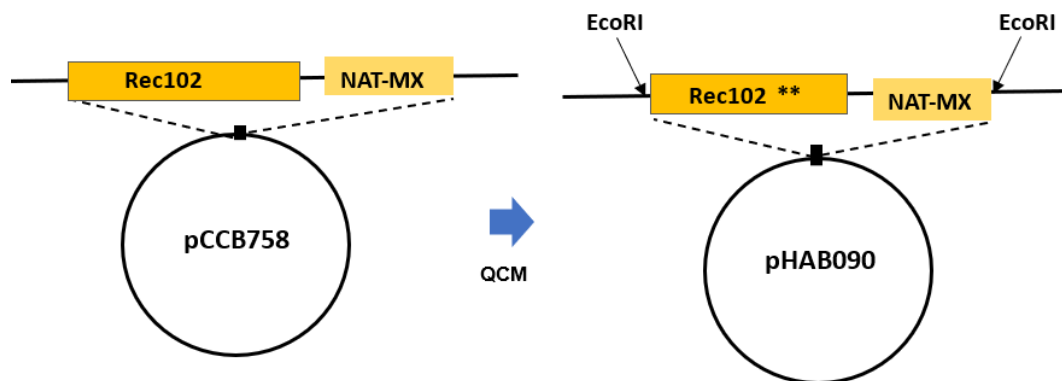


Figure 17: stratégie de construction du plasmide utilisé pour la souche de levure Rec102 mutante Rec102-K79E/R89E (090)

Pour cette étape, nous avons digéré le plasmide pHAB090 obtenu après QCM avec l'enzyme de restriction EcoRI. Le produit de digestion a été chargé sur gel agarose avec le plasmide non coupé comme contrôle négatif. Le résultat obtenu est consigné en **Figure 18**, ou on peut voir l'apparition de deux bandes d'ADN. La 1ere correspondant au backbone du plasmide digéré (3501 kb) et la seconde bande correspondant à la séquence de la protéine Rec102 suivie de la cassette de résistance NAT-MX (2764 kb)

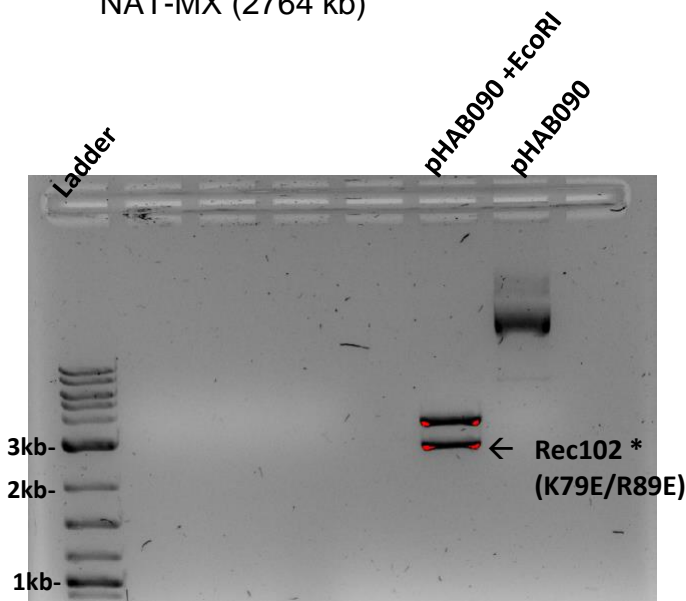


Figure 18: Résultat du gel agarose présentant les produits de digestion du plasmide pHAB090 par EcoRI

4.2.2.3 Transformation en levures et PCR génotypage

À la suite du gel, le fragment qui contient le gène Rec102 suivi de sa cassette de résistance a été extrait du gel puis transformé dans des levures Wild type de souche CBY6 (**Tableau 3**) et étalé sur milieu YPD+NAT. Après 3 jours de croissance, des colonies ont été piquées et stockées dans du glycérol à -80°C d'une part et d'autre part une extraction d'ADN génomique a été réalisée sur les 9 clones sélectionnées et conservées. Cet ADN a été utilisé plus tard pour réaliser un PCR génotypage dans le but de vérifier la présence effective de notre fragment d'intérêt dans les levures transformées. Pour ce faire, nous avons utilisé une amorce qui s'hybride sur la cassette de résistance, et une autre amorce qui s'hybride en amont du gène Rec102, sur l'ADN génomique comme l'indique l'illustration de la **Figure 19A**. Les produits de PCR ont été déposés sur gel agarose. Les résultats **Figure 19B** montrent que notre séquence est bien présente dans les clones 1, 2 et 4 mais probablement pas chez 3 car le produit PCR obtenu n'est pas aussi prononcé que chez les 3 autres.

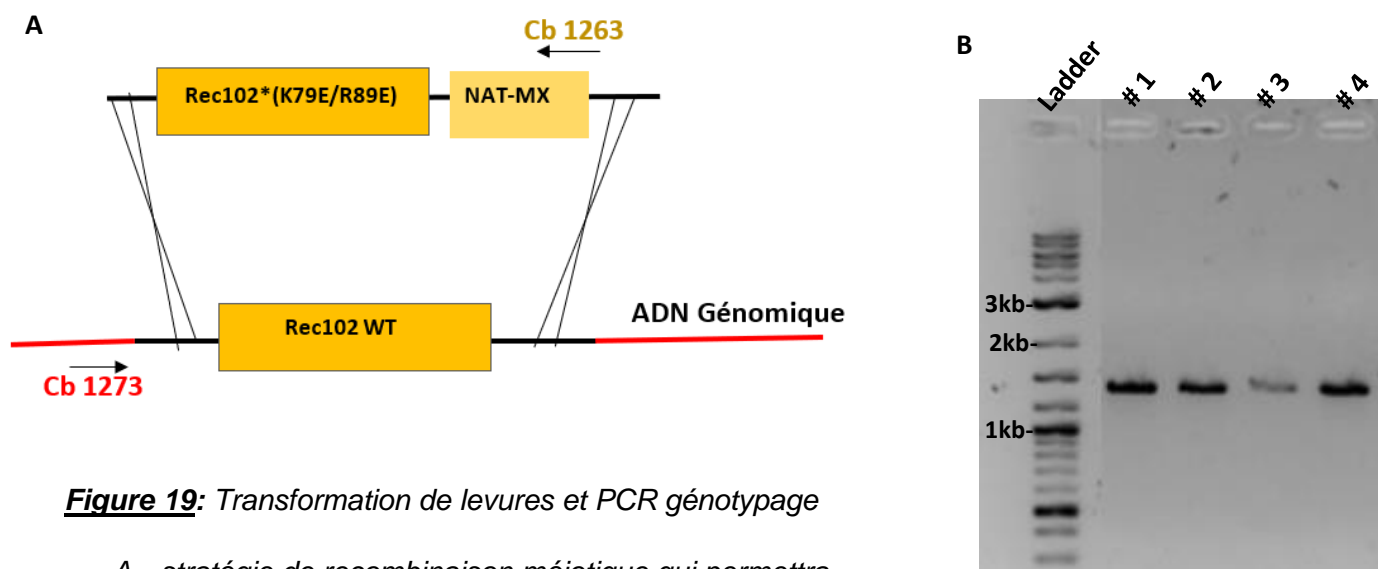


Figure 19: Transformation de levures et PCR génotypage

- A- stratégie de recombinaison méiotique qui permettra d'obtenir des levures transformées
- B- résultats du PCR génotypage réalisé avec les amorces cb1273 et cb1263 sur un gel d'agarose

4.2.2.4 PCR clean-up et séquençage

On débute la purification des produits PCR obtenus à la suite du PCR génotypage par le biais d'un protocole de purification d'ADN présent au laboratoire. Après l'obtention de l'ADN génomique purifié des 3 clones jugés intéressants à la suite de l'étape préalable, nous les avons envoyé pour séquençage. Les résultats indiquaient que seul le clone 4 présentait la séquence Rec102 doublement mutée exempt de nouvelle mutation au bon endroit dans l'ADN génomique des souches construites. Nous obtenons au bout de cette étape, la souche MATa Rec102^{K79E/R89E}. La prochaine étape serait de générer le mating type α (MAT α) possédant les mêmes mutations sur la protéines Rec102. Ensuite de tester les souches par le biais d'un test de viabilité des spores et quantifier la formation des cassures doubles brins sur l'ADN.

4.2.2.5 Dimérisation de Spo11.

Grace à des expériences d'AFM et de size-exclusion chromatography and multiangle light scattering (SEC-MALS), la stœchiométrie du core complex a été déterminée à 1:1:1:1, contrairement à ce qui avait été imaginé sur base de la structure

hétéro-tétramérique (A_2B_2) de TopoVI (Claeys Bouuaert et al., 2021). Cependant, la liaison du core complex à l'ADN pourrait entraîner une dimérisation de celui-ci pour assurer la coupures double brins sur l'ADN. Par ailleurs, le récent avènement de la structure du core complex obtenue par Cryo-EM (**Figure 9**) a permis de cibler des résidus présents sur la protéine Spo11 et qui pourraient être impliqués dans la dimérisation du core complex et la genèse de cassures double brins sur un duplex d'ADN.

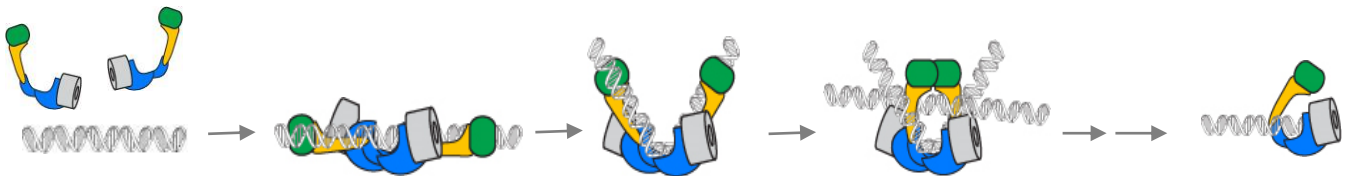


Figure 20 : Illustration du modèle de dimérisation du core complex pour la formation des cassures doubles brins sur l'ADN

Pour tester cette hypothèse, nous avons muté les résidus identifiés sur base de la structure Cryo-EM du core complex monomérique (**Figure 21**), recherché des défaut de recombinaison et caractérisation in vitro de ces mutants. Nous nous sommes intéressés par des mutants défectueux en test de complémentation. Malheureusement, après avoir généré les mutants pour cette protéine, nous n'avons pas pu entamer des investigations pour les tests de complémentation sur les mutants générés car il m'a été impossible d'obtenir des levures diploïdes dû à un problème avec la souche Spo11 nécessaire pour le RTG. Cette souche doit être reconstruite avant de pouvoir analyser les mutants. Concernant le test d'interaction, il est pas possible de le réaliser sur les mutants de la protéine Spo11 parce qu'il n'existe pas de système de fusion viable pour cette protéine.

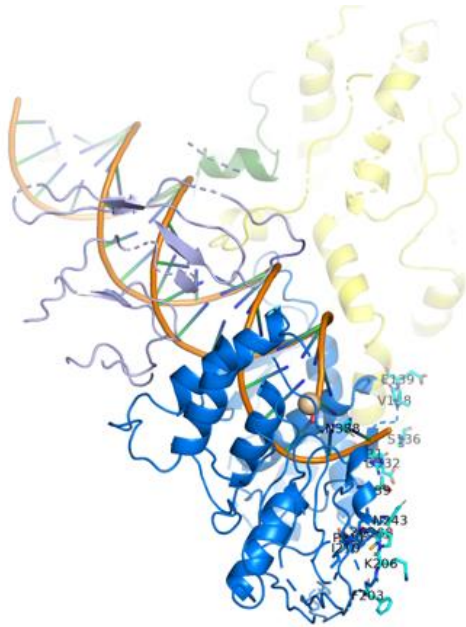


Figure 21 : Structure du core complex obtenue par Cryo-EM et montrant la position des résidus identifiés sur la protéine Spo11 (bleu) présents sur sa face latérale et représentant le potentiel interface de dimérisation du core complex.

4.2.3 Rôle de Ski8 au sein du core complex.

Le rôle de la protéine Ski8 au sein du core complex n'est pas bien connu. Sur base de notre hypothèse que le core complex interagit avec deux duplexes d'ADN (segment G et T), comme TopoVI, des résidus présents dans la protéine Ski8 pourraient également être impliqués dans des interactions avec l'ADN. Pour tester cette hypothèse, nous avons sélectionné et muté sur base de la structure Cryo-EM du core complex monomérique, des résidus qui pointent en direction de la cavité qui pourrait accommoder le segment T d'ADN (**Figure 22**).

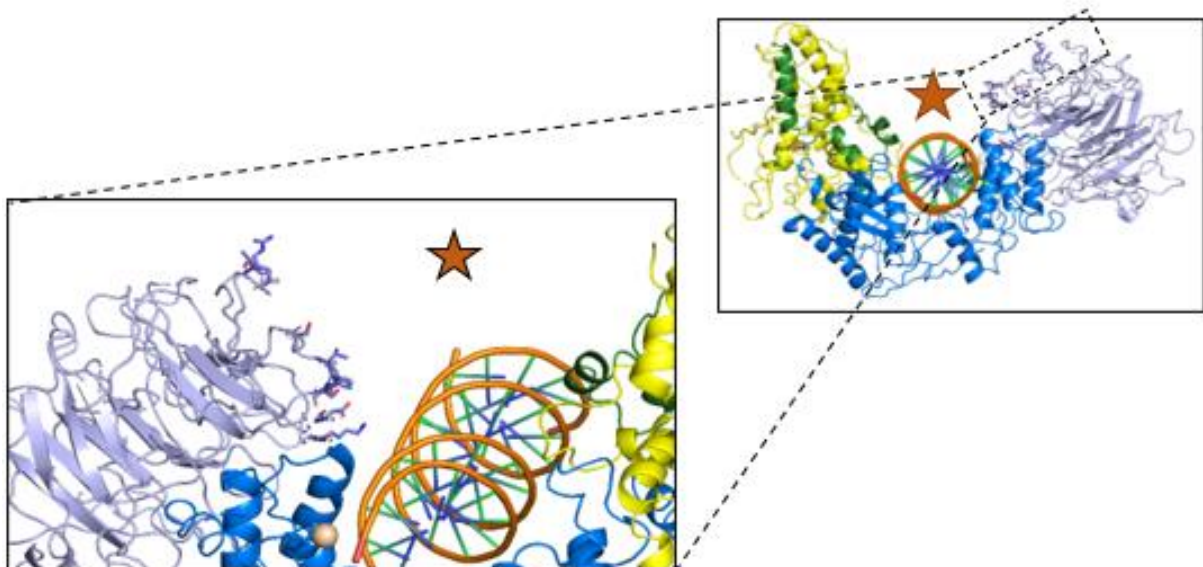


Figure 22 : Structure de la protéine Ski8 (gris) obtenue par Cryo-EM et montrant la position des résidus identifiés et testés en heteroallele recombination assay et yeast two hybrid

Nous avons ensuite recherché des défauts de recombinaison en test de complémentation et vérifié l'interaction entre les protéines testées par yeast two hybrid. Les mutants auxquels nous nous intéressons sont défectueux en test de complémentation et effectif en test d'interaction. Au vu des résultats présentés **Figure 23** et **Figure 24**, nous remarquons que les 3 mutants Ski8 générés présentent à la suite des tests de complémentation et d'interaction, des phénotypes intéressants pour la suite des investigations. Car ils abolissent totalement la recombinaison mais maintiennent l'interaction entre les différents interactants Rec104 et Spo11. Ces résultats suggèrent la possibilité que ces résidus pourraient être impliqués dans l'interaction avec l'ADN. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons une expérience d'Atomic Force Microscopy (AFM) entre les core complex mutants et de l'ADN. Il existe cependant d'autres possibilités, notamment que les résidus sont importants pour l'interaction entre Ski8 et d'autres protéines nécessaires à la formation des cassures doubles brins.

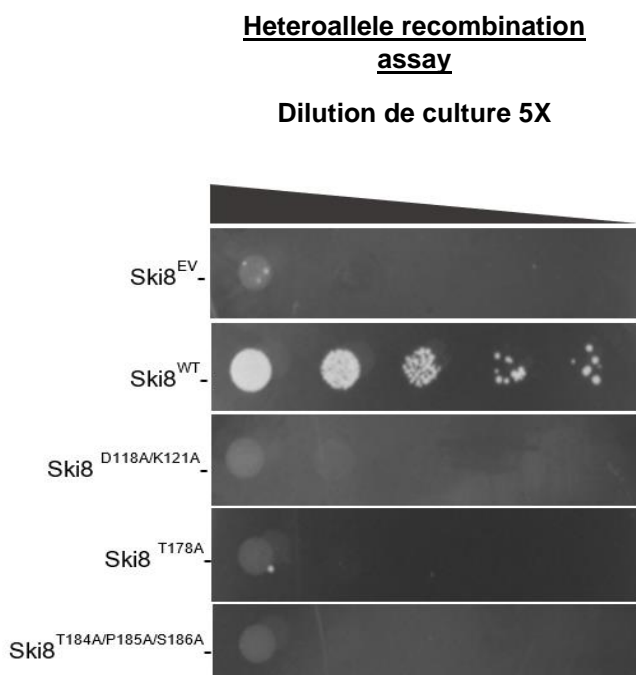


Figure 23:

Résultats de RTG mutants Ski8 qui montrent une abolition complète de l'activité de recombinaison des mutants en comparaison avec le contrôle positif ($Ski8^{WT}$) et le contrôle négatif ($Ski8^{EV}$)

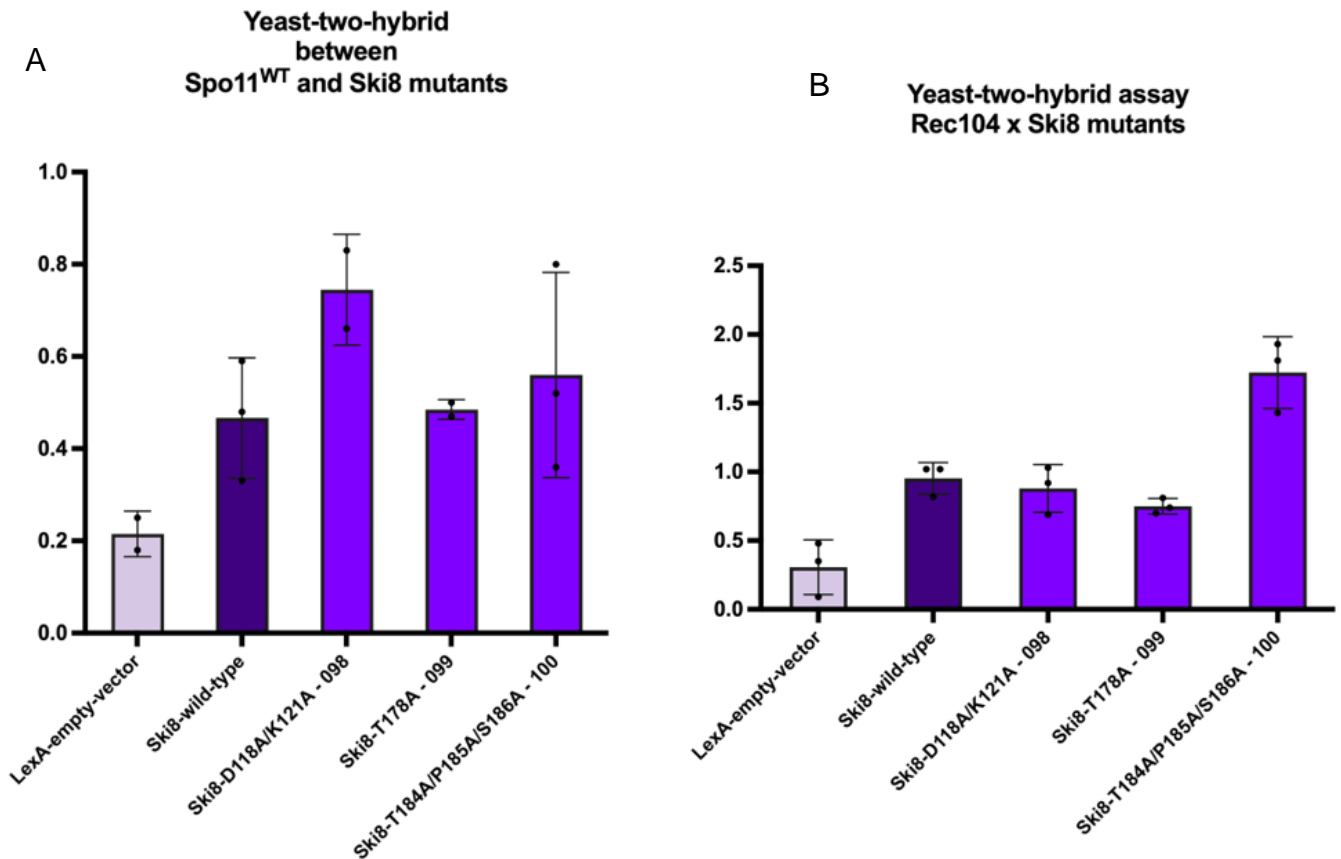


Figure 24 : Résultats de yeast two Hybrid sur mutants Ski8 fusionnées au domaine LexA et la protéine Spo11 fusionnée à au domaine Gal4.

- A- les mutants Ski8 montrent de bonnes interactions avec la protéine Spo11 en comparaison avec Ski8^{WT} (contrôle positif)
- B- les mutants Ski8 montrent de bonnes interactions avec la protéine Rec104 en comparaison aux contrôles positifs et négatifs

5 Conclusion

Au cours de ce travail, il a été question d'étudier le rôle des protéines constitutives du core complex méiotique au cours de la formation des cassures doubles brins. Basé sur une hypothèse portant sur l'importance d'un motif conservé kink (de la protéine Rec102 des levures *S. cerevisiae*) dans des changements de configuration impliqués lors de la formation des cassures d'ADN, il en ressort au vu des résultats obtenus que le kink a probablement un rôle fondamentalement structural, et n'est donc pas nécessairement lié à des transitions conformationnelles du core complex. Par ailleurs, l'étude des phénotypes obtenus sur les mutants des protéines Rec104 par le biais d'un test de sensibilité à la chaleur, révèle une légère baisse de l'activité de recombinaison de ces mutants comparé à la protéine native. On pourrait suggérer de reprendre cette expérience afin de les confirmer. Mais aussi, explorer la possibilité de combiner des résidus et d'étudier leurs effets sur l'activité de recombinaison méiotique. Par contre, pour la protéine Rec102, des résultats pour le test des mutants en conditions de stress thermique sont encore à obtenir et donc à analyser. Des investigations passant par l'obtention d'une souche MATa Rec102 doublement mutée ont été réalisées, mais des résultats définitifs sont en attente. Quant au processus de dimérisation du core complex via Spo11 (endonucléase méiotique), des résidus mutés et pensés importants pour la dimérisation ont été générés mais pas encore testés pour évaluer leurs défauts de recombinaison. Ski8 est la protéine dont le rôle est le moins connu, sur base de l'analyse de la structure Cryo-EM monomérique du core complex, des résidus identifiés et mutés ont été testés et les résultats obtenus suggèrent qu'ils seraient impliqués dans une activité de capture du segment d'ADN T. cependant, d'autres possibilités sont envisageables et nécessitent d'être testé afin d'obtenir des résultats plus claires.

6 Bibliographies

Arora, C., Kee, K., Maleki, S., & Keeney, S. (2004). Antiviral Protein Ski8 Is a Direct Partner of Spo11 in Meiotic DNA Break Formation, Independent of Its Cytoplasmic Role in RNA Metabolism. *Molecular Cell*, 13(4), 549-559. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00063-2)

Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.-C., Nicolas, A., & Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, 386(6623), 414-417. <https://doi.org/10.1038/386414a0>

Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases : Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 369-413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>

Claeys Bouuaert, C., Tischfield, S. E., Pu, S., Mimitou, E. P., Arias-Palomo, E., Berger, J. M., & Keeney, S. (2021). Structural and functional characterization of the Spo11 core complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(1), 92-102. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00534-w>

Corbett, K. D. (2003). Structure of the topoisomerase VI-B subunit : Implications for type II topoisomerase mechanism and evolution. *The EMBO Journal*, 22(1), 151-163. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg008>

Corbett, K. D., Benedetti, P., & Berger, J. M. (2007). Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(7), 611-619. <https://doi.org/10.1038/nsmb1264>

- Gadelle, D., Filée, J., Buhler, C., & Forterre, P. (2003). Phylogenomics of type II DNA topoisomerases : Review articles. *BioEssays*, 25(3), 232-242.
<https://doi.org/10.1002/bies.10245>
- Hunter, N. (2015). Meiotic Recombination : The Essence of Heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a016618. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016618>
- Kee, K., & Keeney, S. (2002). Functional Interactions Between *SPO11* and *REC102* During Initiation of Meiotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 160(1), 111-122. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.111>
- Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 52, p. 1-53). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(01\)52008-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(01)52008-6)
- Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. (1997). Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. *Cell*, 88(3), 375-384. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81876-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81876-0)
- Lam, I., & Keeney, S. (2015). Mechanism and Regulation of Meiotic Recombination Initiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016634.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016634>
- Mimitou, E. P., Yamada, S., & Keeney, S. (2017). A global view of meiotic double-strand break end resection. 7.
- Neale, M. J. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *NATURE*, 436, 1053-1057.
- Nichols, M. D. (1999). Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO Journal*, 18(21), 6177-6188. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.6177>

- Page, S. L., & Hawley, R. S. (2003). Chromosome Choreography : The Meiotic Ballet. *Science*, 301(5634), 785-789. <https://doi.org/10.1126/science.1086605>
- Pyatnitskaya, A., Borde, V., & De Muyt, A. (2019). Crossing and zipping : Molecular duties of the ZMM proteins in meiosis. *Chromosoma*, 128(3), 181-198. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00714-8>
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., & Guichard, V. (2016). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science*, 351(6276), 943-949. <https://doi.org/10.1126/science.aad5309>
- Sasanuma, H., Murakami, H., Fukuda, T., Shibata, T., Nicolas, A., & Ohta, K. (2007). Meiotic association between Spo11 regulated by Rec102, Rec104 and Rec114. *Nucleic Acids Research*, 35(4), 1119-1133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1162>
- Symington, L. S. (2016). Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51(3), 195-212. <https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1172552>
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., Mézard, C., Mayer, C., & Grelon, M. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science*, 351(6276), 939-943. <https://doi.org/10.1126/science.aad5196>
- Wendorff, T. J., & Berger, J. M. (2018). Topoisomerase VI senses and exploits both DNA crossings and bends to facilitate strand passage. *ELife*, 7, e31724. <https://doi.org/10.7554/eLife.31724>
- Wright, W. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *JBC Papers*. <https://doi.org/10.1074/jbc>

Yadav, V. K., & Claeys Bouuaert, C. (2021). Mechanism and Control of Meiotic DNA Double-Strand Break Formation in *S. cerevisiae*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 642737. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642737>

7 Annexes

Annexe 1 : Alignement de séquences pour la protéine Rec102 (haut) et rec104 (bas)

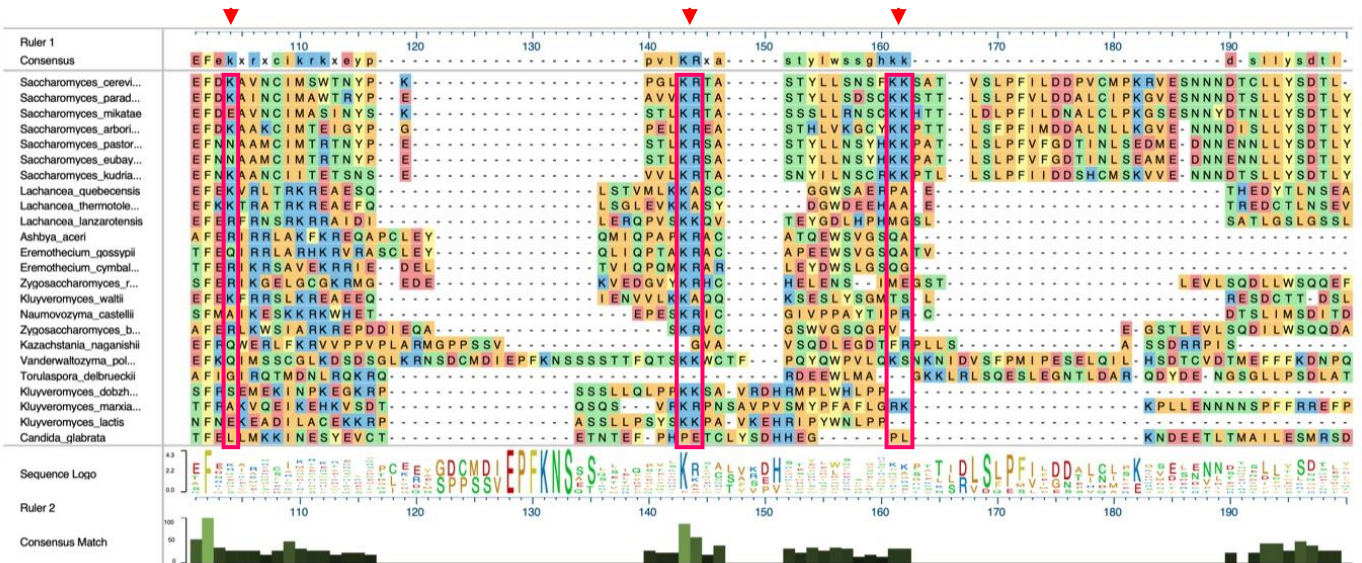


Tableau 1 : Liste des plasmides

Nom	Construction	Résistance	Commentaires
pCCB206	pSMT3	Kan	
pCCB634	Yeast-2-hybrid vector Rec102 in pCA1 (= pSK282, Charan)	Amp	
pCCB758	Spo11 WT	Kan	
Pccb765	empty vector	Amp	contrôle négatif pour mutant Spo11
pCCB767	Spo11WT-(HisFlag??) – HphMX6		
pHAB002	Ski8	Amp	
pHAB008	Rec104-H19D in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB009	Rec104-K39E/R40E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB010	Rec104-K48E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB011	Rec104-K65E/R66E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB012	Rec104-K78E/K79E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB013	Rec104-K97E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB014	Rec104-R122E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB015	Rec104-R147E in pSK293 (Y2H vector)	Amp	
pHAB017	Rec102-K79E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB018	Rec102-R81E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB019	Rec102-R89E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB020	Rec102-K129E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB022	Rec102-H136A in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB023	Rec102-K138E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB030	Rec102-R68E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB032	Rec102-K60E in pCCB634 (Y2H vector)	Amp	
pHAB085	Rec102-R245E	Amp	construit sur pSK282
pHAB086	Rec102-R245E	Kan	construit sur pCCB758
pHAB087	Rec102-R245E	Amp	construit sur pHAB001

pHAB088	Rec102-R89E in pCCB758 (=Rec102 with intron followed by NatMX6 cassette_eq. pHAB019)	Nat	construit sur pCCB758
pHAB089	Rec102-K79E/R89E in pSK282 (=pCCB634 ; Y2H vector)	Amp	Construit sur pHAB017 avec les primers de pHAB019
pHAB090	Rec102-K79E/R89E in pCCB758 (to construct yeast strain)	Kan	Construit sur pHAB089 pour les souches de levures (CBY6)
pHAB091	Spo11-R131A/D132A + cassette HphMX6	Amp	QCM sur pCCB767 avec primers ab232 & ab233
pHAB092	Spo11-S136A/V138A/E139A + cassette HphMX6	Amp	QCM sur pCCB767 avec primers ab234 & ab235
pHAB093	Spo11-F203A + cassette HphMX6	Amp	QCM sur pCCB767 avec primers ab228 & ab229
pHAB094	Spo11-F203A/K206A/P207A + cassette HphMX6	Amp	QCM sur pCCB767 avec primers ab230 & ab231
pHAB095	Spo11-T239A/N243A + cassette HphMX6	Amp	QCM sur pCCB767 avec primers ab216 & ab217
pHAB096	Spo11-N388A/E389A + cassette HphMX6	Amp	QCM sur pCCB767 avec primers ab236 & ab237
pHAB097	His-SUMO-Ski8-WT (in pCCB206_pSMT3)	Kan	Gibson sur pCCB206 et Ski8 amplifié de pHAB002
pHAB098	Ski8-LexA-D118A/K121A (in pSK289 Y2H vector)	Amp	QCM sur pSK289 avec primers ab220 & ab221
pHAB099	Ski8-LexA-T178A (in pSK289 Y2H vector)	Amp	QCM sur pSK289 avec primers ab222 & ab223
pHAB100	Ski8-LexA-T184A/P185A/S186A (in pSK289 Y2H vector)	Amp	QCM sur pSK289 avec primers ab224 & ab225
pHAB101	Ski8-LexA-T216A/R218A (in pSK289 Y2H vector)	Amp	QCM sur pSK289 avec primers ab226 & ab227
pHAB102	His-SUMO-Ski8-G36D (in pSMT3) (A. Hochwagen's mutant)	Kan	QCM sur pHAB097 avec primers ab214 & ab215 (Andrea's mutant)
pHAB103	Rec102-R243E/R244E/R245E	Amp	Construit sur pHAB001
pHAB109	Ski8-LexA_G36D (in pSK289 Y2H vector)	Kan	QCM sur pSK289 avec primers
pSK272	Empty vector	Amp	
pSK275	Empty vector	Amp	
pSK279	LexA-Ski8	Amp	Plasmides de RTG
pSK282	LexA-Rec102 WT		
pSK289	Ski8-lexA	Amp	Plasmide de RTG
pSK293	LexA-Rec104 WT	Amp	Plasmides de RTG
pSK 298	Gal4 (AD)-Spo11 (Y2H vector)	Amp	Plasmide de Y2H
pSK299	Gal4-Ski8	Amp	Plasmide de RTG
pSK305	Spo11-Gal4 (AD) (Y2H vector)	Amp	Plasmide de Y2H
pSK310	Rec104-Gal4(AD) (= pSK310) (Y2H vector)	Amp	Plasmide de Y2H

Tableau 2 : Liste des oligos (primers)

Nom	Séquences 5'-3'	CDS
ab035	GCAAGAGTTGTTTACAgAATTGCGCGAGATTGTAG	Rec102-K79E in pCCB634
ab036	CTACAATCTCGCGCAATTcTGTAACAACCTCTTGC	Rec102-K79E in pCCB634
ab039	GATTGTAGGTTCAAGTATTgaaTTTTGGGAGGAACAAC	Rec102-R89E in pCCB634
ab040	GTTGTTCTCCCAAAttcAATACTTGAACCTACAATC	Rec102-R89E in pCCB634
ab 214	GTAAGTTGTTTCAGGTGACGATTACTTAAAGGTGTGG	A Hochwagen mutant (G36D)
ab 215	CCACACCTTTAAGTAAtCGTCACCTGAACAACCTTAC	A Hochwagen mutant (G36D)
ab 220	GATCTTCTAGACTCAGcCATGAAAgcGCATTCCTTTTGGG C	Ski8 D118A/K121A
ab 221	GCCCAAAGGAATGCgcTTTCATGgCTGAGTCTAGAAGATC	Ski8 D118A/K121A
ab 222	GTTAGAATTACAAGGCgCTGTGCAATCGCCTATG	Ski8 T178
ab 223	CATAGGCGATTTCGACAGcGCCTTGTAATTCTAAC	Ski8 T178
ab 224	CTGTGCAATCGCCTATGgCTgCAgcTCAATTTGCCACTTC TG	Ski8 T184A/P185A/S186A
ab 225	CAGAAGTGGCAAATTGAgcTGcAGcCATAGGCGATTTCGACAG	Ski8 T184A/P185A/S186A
ab 226	CAAATTTTCAGAACTATCTgCATTAgcCCCGTTGTACAATT TTG	Ski8 T216A/R218A
ab 227	CAAATTGTACAACGGGgcTAATGcAGATAGTTCTGAAAT TTG	Ski8 T216A/R218A
ab 228	GCAAAGCAAACAATTgcCTCTGGTAAGCCCTGTC	Spo11 F203
ab 229	GACAGGGCTTACCAGAGgcAATTGTTTGCTTTTGC	Spo11 F203
ab 230	GCAAAGCAAACAATTgcCTCTGGTgcGgCCTGTCTAATT CCATTTTTC	Spo11 F203A/K206A/P207A
ab 231	GAAAATGGAATTAGACAGGcCgcACCAGAGgcAATTGTT TGCTTTTGC	Spo11 F203A/K206A/P207A
ab 232	GTAAAACACTACAGTGgcAGcTATCTTCTACTCCAAC	Spo11 R131A/D132A
ab 233	GTTGGAGTAGAAGATAgCTgcCACTGTAGTGTTTTTAC	Spo11 R131A/D132A
ab 234	GAGAGATATCTTCTACgCCAACGcGGcATTGTTTCAAAG ACAAG	Spo11 S136A/V138A/E139A

ab 235	CTTGTCTTTGAAACAATgCCgCGTTGGcGTAGAAGATATC TCTC	Spo11 S136A/V138A/E1 39A
ab 236	CAAAAGAAAGCTGAAATGgcCGcGATTGATGCCGGAATT TTTAAATAC	Spo11 N388A/E389A
ab 237	GTATTTAAAATTCCGGCATCAATCgCGgcCATTTCAGCT TTCTTTTG	Spo11 N388A/E389A
cb 035	TGGTATGGCTGATTATGATC	Sequencing Primer SV40 polyA
cb 902	GTCGTTGACCTTCGTCAG	Sequencing primer for Rec102 Y2H vector
cb1036	GGCCAAGATTGAACTTAG	Sequencing Y2H pACT2 - Downstream
cb 1183	TCTCTCTTGTATTCTTCC	Sequencing primer for pCA11
cb 1229	TTTGCCGTCCGGAATTGC	Rec102 promoter
cb 1230	TATTCGCTACTCGACCAG	Rec102 terminator
cb 1263	GCGCACGTCAAGACTGTC	Seq primer ~50bp inside MX cassette for pCCB758-759
cb 1273	GGACCAAACCGAACCTG	Rec102 genotyping - upstream

Tableau 3 : Liste des souches

CBY	SKY	MAT	Genotype	Saved by	Background	Origin
CBY1	SKY161	a	ade8	SP	S288c	Keeney
CBY2	SKY162	p	ade8	SP	S288c	Keeney
CBY6	SKY559	a	ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, trp1::hisG	SP	SK1	Keeney
CBY8	SKY520	a	ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-Bgl	SP	SK1	Keeney
CBY11	SKY558	p	ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-nsp	SP	SK1	Keeney
CBY52	SKY661	a	ho::LYS2, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, ndt80::kanMX, LexA(op)-LacZ::URA3	SP	SK1	Keeney

CBY53	SKY662	p	ho::LYS2, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, ndt80::kanMX, LexA(op)-LacZ::URA3	SP	SK1	Keeney
CBY312	SKY1311	p	ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-nsp, rec102D::URA3	Hajar	SK1	Keeney
CBY313	SKY1312	a	ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-bgl, rec102D::URA3	Hajar	SK1	Keeney
CBY467	SKY969	p	ho::LYS2, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-Bgl, spo11Δ::hisG-URA3-hisG	Priyanka	SK1	Keeney
CBY468	SKY970	a	ho::LYS2, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-nsp, spo11Δ::hisG-URA3-hisG	Priyanka	SK1	Keeney
CBY503	SKY972	p	ho::LYS2, ura3, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-Bgl, ski8Δ::KanMX4	CCB	SK1	Keeney
CBY504	SKY973	a	ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, trp1::hisG, arg4-nsp, ski8Δ::KanMX4	CCB	SK1	Keeney

Tableau 4 : Liste des milieux bactériens

Constituants	LB	SOC	2YT
Glucose (dextrose)	-	20g	-
H ₂ Omq	À 1L	À 1L	À 1L
Bacto-tryptone	10g	20g	16g
Bacto-yeast extract	5g	5g	10g
NaCl	10g	2mL	5g
KCL	-	2,5mL	-
MgCl ₂	-	10mL	-
MgSO ₄	-	10mL	-

Tableau 5: Liste des milieux de levures

Constituants	YP	SC-W	SC-L	SC-W-L
H ₂ Omq	900mL	980mL	980mL	980mL
Bacto-peptone	20g	-	-	-
Yeast extract	10g	6,7g	6,7g	6,7g
Yeast without amino acid	-	-	-	-
Glucose	-	20g	20g	20g
Appropriate drop-out powder	-	0,9g	0,9g	0,9g

Tableau 6: Liste des buffers

Constituants	Z-Buffer	Buffer stop reaction	TBE 10X (2L)	KOAc	LiAc	PEG	DMSO	TE (1L)	Tampon de lyse
Na ₂ HPO ₄ , 7H ₂ O	16,1g	-	-	-	-	-	-	-	
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	5,5g	-	-	-	-	-	-	-	
KCL	0,75g	-	-	-	-	-	-	-	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,246g	-	-	-	-	-	-	-	
Na ₂ CO ₃	-								
H ₂ Omq	900mL		to 2L	-	-	-	-	to 1L	
Tris-base		-	216 g	-	-	-	-	-	
Boric Acid		-	110 g	-	-	-	-	-	
EDTA		-	11.6 g	-	-	-	-	-	
1M Tris-HCl pH 8		-	-	-	-	-	-	10 ml	
0.5 M EDTA		-	-	-	-	-	-	2 ml	
KOAc		-	-	10%	-	-		-	
LiAc		-	-	-		50%	-	-	
PEG3350		-	-	-	-	-		-	
1,2M de Sorbitol									

Tableau 7: Liste des réactifs et enzymes

Réactif/ Enzyme	Concentration stock	Concentration de travail
Glucose	20g/L	0,5g/L
Raffinose	20g/L	0,2g/L
Galactose	20g/L	0,5g/L
Ampicilline	100mg/ml d'H ₂ O	100µg/ml
Kanamycine	50mg/ml	50µg/ml
IPTG	1M	
ONPG		4mg/ml

Tableau 8: Liste des machines électroniques

Appareil	Référence	Utilisation
Microcentrifugeuse	MiniStar	Centrifuger de petits échantillons
Mini-centrifugeuse	Eppendorf/5425, /5417C and /5430	Centrifuger de petits échantillons
Centrifugeuse	Eppendorf/5804R (rpm max = 4200)	Centrifuger de grands échantillons

Autoclaves (deux tailles)	SYSTEC/VB-95 (159258)	Stériliser le matériel ou des milieux de culture
	PBI (02564)	
Machine de révélation de protéines	Amersham Imager 600	Révéler la présence de protéines sur les gels (colorimétrique) ou membranes (chemiluminescence)
Machine d'électrophorèse d'ADN	Power Pac Basic Power Supply (1645050)	Migration d'ADN sur gel d'agarose
DNA electrophoresis vat	Sub-Cell GT Horizontal Electrophoresis System (1704401)	Contient le gel d'agarose et le tampon de migration
	Mini-Sub Cell GT Horizontal Electrophoresis System (1704406)	
DNA ladder (Ladder:Tris EDTA:charge buffer in 1:7:2)	1 kb Plus DNA Ladder (N3200)	Marqueur de taille pour échelle sur gel d'ADN
Imageur UV	Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System	Révéler l'agent intercalant qui est lié à l'ADN
Machine PCR	AB APPLIED BIOSYSTEMS/VERITI	Amplifie les fragments d'ADN